

Mestrado Integrado em Engenharia Química

***Desenvolvimento de uma metodologia analítica
para a deteção de poluentes emergentes em
matrizes ambientais - caso particular do
galaxolide***

Tese de Mestrado

de

João Pedro Simões Teixeira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Orientadora na FEUP: Prof. Doutora Maria Arminda Costa Alves



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Março de 2015

Agradecimentos

À Professora Doutora Arminda Alves, por me ter orientado ao longo deste estudo, acreditando nas minhas capacidades e estando presente quando se revelaram algumas dificuldades. A ela e também ao Professor Doutor Miguel Madeira, por me terem incentivado à realização deste trabalho.

À Professora Patrícia Correia, pelo inquestionável apoio no laboratório, por ter sido uma presença constante durante todo o meu trabalho e por me ter incentivado sempre nos momentos árduos.

À Professora Doutora Lúcia Santos, pela partilha dos seus vastos conhecimentos em química orgânica, pela orientação, simpatia e presença.

A todos os que me ajudaram e proporcionaram um excelente ambiente de trabalho, em especial o Sr. Serafim, a Fátima e o José Luís.

Aos meus pais, à minha avó, à minha família paulistana, pela preocupação, por me terem proporcionado esta oportunidade sem nunca terem desistido de mim depois destes anos de estudo.

À família penafidelse, por daquela maneira subtil, me terem estendido a mão quando mais dela necessitei.

Àqueles amigos raros que sempre se lembraram de mim e me abriram a cortina da motivação.

Resumo

Os *musks* são um dos grupos de fragrâncias mais importantes e utilizados em perfumaria. Devido ao elevado custo e incerteza no aprovisionamento dos *musks* naturais, estes foram substituídos há várias décadas por *musks* sintéticos com propriedades e características odoríferas semelhantes àqueles com substâncias naturais. O elevado crescimento e procura dos *musks*, repercutiu-se numa indústria de *musks* sintéticos à escala global. Nos dias de hoje, a maioria dos *musks* usados em fragrâncias e cosméticos são de origem sintética. A extração dispersa em fase sólida usando a metodologia QuEChERS seguida de detecção por cromatografia líquida de alta performance e detecção por fluorescência (HPLC-FL) foi otimizada para a detecção do *musk* galaxolide (HHCB) em cinco matrizes ambientais sólidas (solos, sedimentos, lamas, casca de pinheiro e composto) e duas matrizes líquidas provenientes dos afluentes e efluentes duma estação de tratamento de águas residuais (ETAR). O método foi validado através dos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Os limites de detecção variaram entre 0.90 e 1.14 µg/kg para matrizes sólidas enquanto que os afluentes e efluentes da ETAR apresentaram limites de quantificação médios de 0.65 µg/L. A precisão intermédia variou desde 0.8% para o composto até 15.5% para os solos. As concentrações em solos e em sedimentos foram cerca de 84 µg/kg e 10 µg/kg, respetivamente. Devido ao elevado log K_{ow} do HHCB, as lamas apresentaram concentrações mais elevadas, cerca de 9×10^3 µg/kg, enquanto que no composto se observaram 18×10^3 µg/kg. As concentrações de HHCB na casca de pinheiro e nas águas residuais foram nulas. Os resultados obtidos confirmaram a versatilidade do método proposto para a determinação e identificação de galaxolide em matrizes ambientais.

Palavras-chave: galaxolide, QuEChERS, HPLC-FL, matrizes ambientais.

Abstract

Musk is one of the most important and often used group of fragrances in perfumery. Due to the high cost and uncertainty of supply of the original natural musk, this has been replaced many decades ago by synthetic musks with fragrance and other properties similar to those of the natural substances. The phenomenal growth demand for musks has created a worldwide synthetic musk industry. Today almost all of the musks used in cosmetics and fragrance products are of synthetic origin. A dispersive solid-phase extraction using QuEChERS methodology followed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL) has been optimised to determine levels of the polycyclic musk galaxolide (HHCB) in five solid environmental matrices (soils, sediments, sludge, pine bark and compost) and two liquid matrices from the influent and effluent from a municipal wastewater treatment plant (WWTP). The method was validated in terms of limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs), precision and recovery. The limits of detection ranged from 0.90 to 1.14 $\mu\text{g/kg}$ for solid matrices whereas WWTP influents and effluents samples presented 0.65 $\mu\text{g/L}$ as mean LODs. The intermediate precision ranged from 0.8% for compost to 15.5% for soils. Concentrations in soils and sediments were about 84 $\mu\text{g/kg}$ and 10 $\mu\text{g/kg}$, respectively. Due to high $\log K_{ow}$ of HHCB, sludge samples presented higher concentrations, about $9 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$, while in compost samples $18 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$ were observed. Pine bark HHCB concentration was null and in wastewater samples as well. The results obtained confirmed the usefulness of the proposed method for determination and identification of HHCB in environmental samples.

Keywords: galaxolide, QuEChERS, HPLC-FL, environmental matrices.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Porto, ____ de Março de 2015

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto.....	1
1.2	Contributos do Trabalho.....	1
1.3	Organização da Tese	2
2	Contexto e Estado da Arte.....	3
2.1	<i>Musks</i> naturais e <i>musks</i> sintéticos.....	3
2.2	Dados de consumo e aspetos legais do galaxolide	5
2.3	Toxicidade do galaxolide	7
2.4	Deteção do galaxolide em matrizes ambientais	7
2.4.1	Solos, Sedimentos e Lamas	8
2.4.2	Águas	10
3	Materiais e Métodos.....	14
3.1	Materiais.....	14
3.1.1	Padrões e reagentes.....	14
3.1.2	Equipamento cromatográfico	14
3.1.3	Plano de Amostragem	15
3.2	Métodos.....	17
3.2.1	Preparação dos padrões analíticos	17
3.2.2	Preparação de amostras sólidas	17
3.2.3	Procedimento de extração	19
3.2.4	Análise cromatográfica	21
4	Resultados e Discussão	22
4.1	Validação do método.....	23
4.2	Incerteza global do método.....	34
5	Conclusões.....	36
	Referências	37
	Anexo	40

Notação e Glossário

Letras gregas

λ Comprimento de onda

Lista de Siglas

ACN	Acetonitrilo
AHTN	Tonalide
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>
d	Diâmetro
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
DEP	Dietilftalato
DL ₅₀	Dose letal média
DSPE	<i>Dispersive solid-phase extraction</i>
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
HHCB	Galaxolide
HPLC-FL	<i>High Performance Liquid Chromatography - Fluorescence Detector</i>
K _{ow}	Coeficiente de partilha octanol-água
MK	<i>Musk ketone</i>
ms	massa seca
MX	<i>Musk xylene</i>
PHCP	Produtos de higiene e cuidado pessoal
PP	Polipropileno
PSA	<i>Primary secondary amine</i>
R ²	Coeficiente de correlação de Pearson
rpm	Rotações por minuto
SBSE	<i>Stir-bar sorptive extraction</i>
SPE	<i>Solid-phase extraction</i>
t _r	Tempo de retenção

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Nomes químicos, nomes comerciais, números CAS, estruturas químicas e fórmulas moleculares de 7 <i>musks</i> policíclicos (Rimkus, 1999).	4
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do HHCB (Balk e Ford, 1999).....	5
Tabela 3 - Produção anual de <i>musks</i> policíclicos no Mundo e na Europa.	6
Tabela 4 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em solos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ms).	8
Tabela 5 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em sedimentos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ms).	9
Tabela 6 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em lamas (mg/kg ms).	9
Tabela 7 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em águas residuais ($\mu\text{g}/\text{L}$).	11
Tabela 8 - Métodos de extração, detecção e dados de validação do HHCB em estudos preliminares.	13
Tabela 9 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para matrizes sólidas ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{amostra}}$).....	28
Tabela 10 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para matrizes líquidas ($\mu\text{g}/\text{L}_{\text{amostra}}$).	28
Tabela 11 - Concentração de HHCB em matrizes sólidas e líquidas e respectivas precisões intermédias.	31
Tabela 12 - Concentrações de HHCB em matrizes sólidas e líquidas analisadas neste estudo, e recuperações (%) determinadas para cada nível de <i>spike</i> adicionado.	33
Tabela 13 - Concentração de galaxolide encontrada em cada matriz e respetiva incerteza global.	35
Tabela 14 - Parâmetros para o cálculo da incerteza da solução mãe.	40
Tabela 15 - Erros associados aos instrumentos de medição e incerteza dos padrões analíticos, U_1 (Correia <i>et al.</i> , 2013).	40
Tabela 16 - Parâmetros para o cálculo de U_2 (Correia <i>et al.</i> , 2013).....	41
Tabela 17 - Parâmetros para o cálculo de U_3 (Correia <i>et al.</i> , 2013).....	42
Tabela 18 - Parâmetros para o cálculo de U_4	42
Tabela 19 - Resultados do cálculo das incertezas globais para os padrões analíticos.	43

Índice de Figuras

Figura 1 - Estruturas químicas de fragrâncias sintéticas: <i>musks</i> azotados (musk xylene), <i>musks</i> policíclicos (galaxolide), <i>musks</i> macrocíclicos (exaltolide) (OSPAR Comissão, 2004) e <i>musks</i> alicíclicos (romandolide) (Eh, 2004).....	3
Figura 2 - Dados de consumo do HHCB na Europa (OSPAR Comissão, 2004; HERA 2004b; Clara, Gans <i>et al.</i> , 2011).....	6
Figura 3 - Vista aérea da ETAR (1: SOL-ETAR; 2: COMP). Fonte: www.google.pt/maps	15
Figura 4 - <i>Flowsheet</i> da ETAR. 1: AFL; 2: EFL; 3: LAM. (CMM, 2002).....	16
Figura 5 - HPLC com detetor por fluorescência.	17
Figura 6 - Esquema representativo do método de preparação de amostras.	18
Figura 7 - Esquema representativo do método de extração por QuEChERS.	20
Figura 8 - Cromatograma de uma solução padrão de galaxolide ($200 \mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{L}$).....	23
Figura 9 - Exemplo de uma carta de controlo de Shewhart.....	24
Figura 10 - Carta de controlo com os limites superior (LSC), inferior (LIC) e central (LC) e linhas correspondentes aos desvios padrão.	25
Figura 11 - Carta de controlo referente ao padrão de controlo ($200 \mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{L}$) usado diariamente na análise cromatográfica.	26
Figura 12 - Reta de calibração de equação $y = 8994.9x + 2165.1$ e $R^2 = 0.9997$ (Correia <i>et al.</i> , 2013). .	27
Figura 13 - Cromatograma da matriz SOL-FEUP ($83.8 \mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{kg}$).....	29
Figura 14 - Cromatograma da matriz LAM ($9.3 \times 10^3 \mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{kg}$).	30
Figura 15 - Cromatograma da matriz COMP ($17.6 \times 10^3 \mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{kg}$).	30
Figura 16 - Incerteza global (%) do método associado à concentração de galaxolide ($\text{mg}/\text{kg}_{\text{amostra}}$) em (a) SOL-FEUP, (b) SED-LEIX, (c) LAM, (d) COMP.	35

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

Poluentes emergentes são substâncias químicas usadas no dia-a-dia, tais como em produtos de higiene e cuidado pessoal (PHCP), protetores solares, medicamentos, detergentes domésticos, entre outros e que acabam por ir parar aos esgotos. Quando estes são tratados, muitas vezes estas substâncias não são removidas totalmente e acabam por contaminar o ambiente e as águas. Esta situação toma mais relevo em zonas urbanas densamente povoadas, criando preocupações, por exemplo, em ecossistemas ambientais bem como para a segurança e saúde humana. Entre estes, destacam-se os produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, que incluem fármacos bem como outros compostos, sendo as fragrâncias sintéticas, e particularmente os *musks*, um dos grupos mais amplamente utilizado.

Os *musks* sintéticos são fragrâncias semivoláteis e lipofílicas usadas desde 1930 como alternativas mais económicas aos *musks* naturais numa vasta variedade de produtos domésticos e industriais, detergentes, cosméticos, champôs, perfumes, tabaco e aditivos alimentares. A maioria dos *musks* sintéticos é despendida em ambiente doméstico e é encontrada em produtos de higiene e cuidado pessoal que são lançados para a rede de esgotos após aplicação e, consequentemente, a principal fonte de propagação de *musks* sintéticos no ambiente é através de efluentes de ETAR e lamas. Cerca de 50 a 90% dos *musks* são eliminados em ETAR, enquanto que 40% do galaxolide é eliminado durante a digestão anaeróbia em lamas.

Para encarar este problema é necessário saber se os poluentes emergentes estão presentes, onde, e a que níveis se encontram. Para isso é preciso desenvolver métodos sensíveis e baratos para aplicar de modo expedito em matrizes ambientais.

1.2 Contributos do Trabalho

A contribuição deste trabalho prende-se pela adoção de um método otimizado por Correia *et al.* (2013) para a deteção de galaxolide (HHCB) em produtos de higiene e cuidado pessoal por HPLC-FL, baseado na extração da matriz numa fase sólida dispersa. Este método foi denominado de QuEChERS, dado que é rápido (*Quick*), simples (*Easy*), económico (*Cheap*), eficaz (*Effective*), robusto (*Rugged*) e seguro (*Safe*). Pretende-se neste trabalho alargar o estudo à análise de galaxolide nas seguintes matrizes ambientais: solos, sedimentos, lamas, casca de pinheiro, composto e águas residuais.

1.3 Organização da Tese

Esta tese está dividida em quatro capítulos cujo breve resumo é apresentado de seguida:

2. *Estado da Arte*

Neste tópico é apresentado o composto a analisar, as suas propriedades físico-químicas e as fontes de libertação do mesmo para o ambiente. De um modo mais específico são abordados os estudos recentes realizados, bem como a evolução nas metodologias de análise.

3. *Materiais e Métodos*

Neste capítulo são referidos os materiais e reagentes utilizados, descrito o equipamento utilizado e os métodos (condições operatórias) adotados.

4. *Resultados e Discussão*

São apresentados os resultados da validação do método, as concentrações de galaxolide obtidas nas matrizes analisadas (solos, sedimentos, lamas, casca de pinheiro, composto e águas residuais) e a sua respetiva discussão, comparando com os estudos similares.

5. *Conclusões*

São apresentados, resumidamente, os resultados deste trabalho experimental e uma crítica geral ao trabalho efetuado.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 *Musks* naturais e *musks* sintéticos

As fragrâncias são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas para proporcionar um aroma agradável e duradouro aos objetos e usualmente ao corpo humano.

Os *musks* são das fragrâncias sintéticas mais importantes e usadas na perfumaria. Os *musks* naturais são compostos extraídos de animais, como as secreções dos veados almiscarados, mas também de plantas (OSPAR Comissão, 2004). Devido ao seu elevado custo e provisionamento incerto, os *musks* naturais têm vindo a ser substituídos há várias décadas atrás por *musks* sintéticos com propriedades e fragrâncias similares aos primeiros. Hoje em dia, a maior parte dos *musks* usados em cosméticos e produtos perfumados são de origem sintética, levando ao crescimento abrupto da indústria mundial de *musks* (Rimkus, 1999b). Quimicamente, os *musks* sintéticos encontram-se divididos em quatro grandes grupos (Figura 1): os *musks* azotados, os *musks* policíclicos, os *musks* macrocíclicos e os *musks* alicíclicos (Eh, 2004).

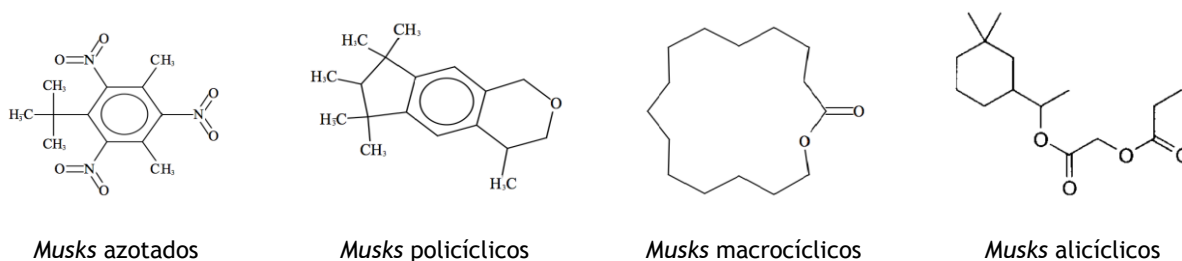
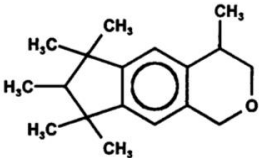
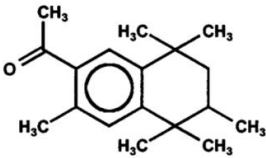
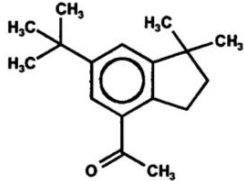
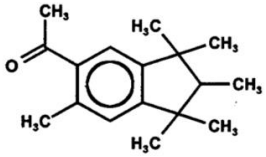
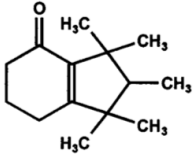
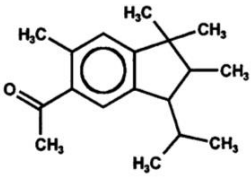
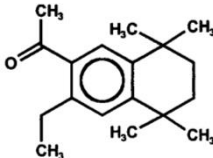


Figura 1 - Estruturas químicas de fragrâncias sintéticas: *musks* azotados (musk xylene), *musks* policíclicos (galaxolide), *musks* macrocíclicos (exaltolide) (OSPAR Comissão, 2004) e *musks* alicíclicos (romandolide) (Eh, 2004).

Os *musks* azotados foram os *musks* sintéticos a serem usados nas primeiras décadas do século XX. Na década de 50, foi introduzido outro grupo importante de *musks* sintéticos, os *musks* policíclicos. A Tabela 1 apresenta sete *musks* policíclicos e suas respectivas propriedades.

Tabela 1 - Nomes químicos, nomes comerciais, números CAS, estruturas químicas e fórmulas moleculares de 7 musks policíclicos (Rimkus, 1999).

Nome Químico (Abreviatura)	Nome Comercial	Número CAS	Estrutura Química	Fórmula Molecular
1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta-2-benzopirano (HHCB)	Galaxolide®	1222-05-5		C ₁₈ H ₂₆ O
7-acetil-1,1,3,4,4,6-hexamiltetrahidronaftaleno (AHTN)	Tonalide®	1506-02-1		C ₁₈ H ₂₆ O
4-acetil-1,1-dimetil-6-terc-butildihidroindeno (ADBI)	Celestolide®	13171-00-1		C ₁₇ H ₂₄ O
6-acetil-1,1,2,3,3,5-hexametildihidroindeno (AHDI)	Phantolide®	15323-35-0		C ₁₇ H ₂₄ O
6,7-dihidro-1,1,2,3,3-pentametil-4(5H)-indanona (DPMI)	Cashmeran®	33704-61-9		C ₁₄ H ₂₂ O
5-acetil-1,1,2,6-tetrametil-3-isopropil-dihidroindeno (ATII)	Traseolide®	68140-48-7		C ₁₈ H ₂₆ O
7-acetil-1,1,4,4-tetrametil-6-etiltetrahidronaftaleno (ATTN)	Versalide®	88-29-9		C ₁₈ H ₂₆ O

Os *musks* policíclicos são derivados do indano e da tetralina e substituídos por grupos metilo. A sua síntese industrial é relativamente complexa e por isso, em comparação com os *musks* azotados, são mais dispendiosos. Apesar disso, os *musks* policíclicos são ingredientes essenciais na produção de fragrâncias devido às suas propriedades olfativas típicas e capacidade de se fixarem facilmente a têxteis. O galaxolide (HHCB) e o tonalide (AHTN) são

os dois compostos mais importantes neste grupo e ocupam 95% do mercado de *musks* policíclicos (Plassche e Balk, 1997). O tonalide foi contudo descontinuado nos anos 80 devido à ocorrência de efeitos neurotóxicos (Ohloff, 1990).

Os *musks* policíclicos são usados em quase todos os produtos de higiene e de cuidado pessoal (PHCP), tais como perfumes, desodorizantes, cremes, cosméticos, sabonetes, champôs, detergentes da roupa, amaciadores, ambientadores, tabaco, etc. De um modo geral, a solubilidade em água é baixa para todos os *musks*, tendo por isso características apolares. O coeficiente de partilha octanol-água (K_{ow}) no galaxolide é relativamente elevado (Tabela 2), o que indica uma elevada lipossolubilidade. Quanto à sua partição, o HHCB tem tendência para se acumular em matrizes com características orgânicas, tais como lamas ou solos.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do HHCB (Balk e Ford, 1999).

log K_{ow}	5.9
Ponto de ebulição _{1 atm} (°C)	330
Solubilidade em água _{25°C} (mg/L)	1.75
Pressão de vapor (Pa)	0.073
Constante de Henry ((Pa m ³)/mol)	11.3

2.2 Dados de consumo e aspetos legais do galaxolide

Devido ao declínio do uso de fragrâncias naturais por serem dispendiosas, os *musks* azotados e policíclicos foram sendo cada vez mais produzidos e utilizados mundialmente (OSPAR Commission, 2004). Contudo, nas últimas décadas surgiram preocupações com a potencial toxicidade de alguns *musks*, que levaram a restrições na utilização destas fragrâncias na Europa. Como consequência destas restrições, os *musks* azotados foram sendo prescindidos, o que proporcionou o aumento da produção e uso dos *musks* policíclicos. De acordo com um estudo mundial sobre o mercado de *musks* sintéticos (Barbetta *et al.* 1988), a produção de *musks* policíclicos anual era de 4300 t/ano em 1987, aumentando para 5600 t/ano em 1996.

Correia *et al.* (2013) conclui no seu estudo que o risco de exposição do HHCB *per capita* ronda os 900 µg/dia considerando apenas aplicação dérmica. Contudo, assumindo que 22% do HHCB se evapora, cerca de 700 µg/dia ficam efetivamente retidos na pele.

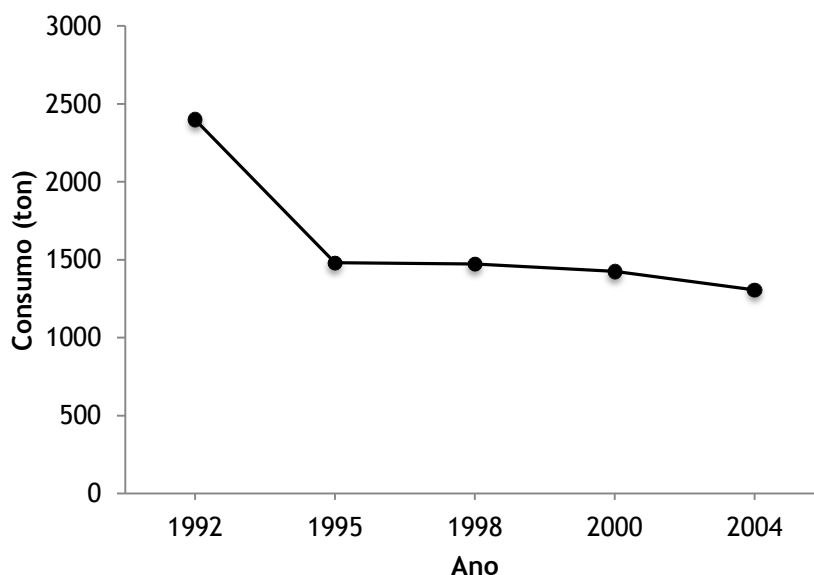
Tabela 3 - Produção anual de *musks* policíclicos no Mundo e na Europa.

Ano	Produção (t/ano)	Mercado mundial (%)	Referência
1987	4300 (Mundo)	61	Barbetta <i>et al.</i> , 1988
1996	5600 (Mundo)	70	Gebauer e Bouter, 1997
1992	3285 (Europa)	-	Balk, 1997
1995	2067 (Europa)	-	Balk, 1997

- sem dados

O aumento da produção dos *musks* policíclicos e consequente declínio dos *musks* azotados deve-se em primeiro lugar a restrições no uso do *musk ambrette* devido a efeitos tóxicos adversos. Os *musks* azotados, em particular o *musk xylene*, têm sido substituídos na Europa Ocidental por *musks* policíclicos (Rimkus e Brunn, 1996; Brunn e Rimkus, 1997; Gebauer e Bouter, 1997).

O uso de fragrâncias em cada vez mais produtos de higiene e cuidado pessoal e o receio de uma consequente bioacumulação em tecidos humanos e de poluição em várias matrizes ambientais, levaram à diminuição do consumo de *musks* policíclicos e de *musks* azotados na Europa. Este declínio tem sido pouco acentuado dado que os *musks* macrocíclicos são muito dispendiosos e, apesar de serem mais económicos, existem apenas dois *musks* alicíclicos comercializados atualmente, romandolide e helvetolide (Eh, 2004).

Figura 2 - Dados de consumo do HHCB na Europa (OSPAR Comissão, 2004; HERA 2004b; Clara, Gans *et al.*, 2011).

2.3 Toxicidade do galaxolide

A toxicidade dos *musks* sintéticos é muito condicionada pela natureza lipofílica e pela intensa utilização dos mesmos. A presença de *musks* policíclicos no ambiente tem sido investigada por vários autores em países diversos (Balk e Ford, 1999a). Os *musks* policíclicos podem causar irritação e sensibilização cutâneas. Podem também afetar o fígado, aumentando o seu volume/peso e descoloração deste. Várias fragrâncias sintéticas usadas atualmente, tal como o HHCB e o AHTN, não são consideradas mutagénicas, carcinogénicas ou genotóxicas, admitindo-se que os *musks* policíclicos são menos tóxicos que os *musks* azotados (Roosens, Covaci *et al.*, 2007).

Relativamente à toxicidade em animais, vários estudos apresentam os efeitos tóxicos dos *musks* policíclicos e dos *musks* azotados em organismos aquáticos (OSPAR Comissão, 2004) e as alterações cutâneas em ratos e coelhos (EURAR - ECHA, 2008). Nestes, sabe-se que a DL_{50} é superior a 3000 mg_{HHCB}/kg de massa corporal, porém não é suficiente para o galaxolide apresentar toxicidade aguda em humanos.

A atividade endócrina foi alvo de estudo por parte de Bitsch, Dudas *et al.* (2002). De todos os *musks* frequentemente usados, apenas o AHTN apresentou atividade estrogénica. No ensaio *E-screen* o HHCB foi considerado estrogénicamente inativo tal como *musks* macrocíclicos com a exceção do *musk muscone* que apresentou atividade moderada. Estes oferecem uma alternativa aos *musks* azotados e policíclicos pois são catabolizados mais rapidamente porém, apresentam a desvantagem de serem mais dispendiosos (Gebauer e Bouter, 1997).

2.4 Detecção do galaxolide em matrizes ambientais

É conhecido que aproximadamente 50 a 90% de HHCB e AHTN são removidos por absorção em lamas que não foram totalmente degradadas durante o tratamento de águas residuais (Bester, 2004; Ternes *et al.*, 2004). A aplicação de lamas e matéria suspensa em campos agrícolas contribui para a libertação de *musks* policíclicos no meio ambiente (Guo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008). Os restantes *musks* policíclicos existentes na fase aquosa são despejados através dos efluentes das ETAR, os quais têm sido usados massivamente para rega em campos agrícolas e jardins públicos (Pedersen *et al.*, 2005). Além disso, alguns estudos assumem que as águas das chuvas infiltram os *musks* policíclicos nos solos e lençóis de água submersos (Fromme *et al.*, 2001; Osemwengie e Gerstenberger, 2004).

2.4.1 Solos, Sedimentos e Lamas

Existem poucos estudos acerca da contaminação de solos por *musks* policíclicos. No Canadá, foi encontrado HHCB com uma concentração de 1 µg/kg de matéria seca num solo agrícola colhido duas semanas depois da aplicação de fertilizantes (Tabela 4). A concentração foi diminuindo ao longo do tempo, contudo, após seis meses ainda era detetável galaxolide nessa matriz (Yang e Metcalf, 2006). Num estudo mais recente (Aguirre *et al.*, 2014), as concentrações de galaxolide rondaram os 5 µg/kg em solos misturados com composto (rácio de 95:5).

Tabela 4 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em solos (µg/kg ms).

Localização	Mét. Analítico	n ^a	C (solos)	LD	LQ	Referência
Canadá	GCMS	3	1	-	0.2 - 1.9 ^b	Yang e Metcalf, 2006
Espanha	GCMS	3	4.6 - 5.3	0.01 - 1.1	-	Aguirre <i>et al.</i> , 2014

GCMS - Gas chromatography-mass spectrometry.

^a número de amostras.

^b massa húmida.

- sem dados.

Lach e Steffen (1997) encontraram concentrações de HHCB e AHTN em sedimentos de rios alemães. A concentração mais baixa estava abaixo do limite de detecção (0.5 µg/kg de matéria seca), ao passo que a concentração mais elevada foi cerca de 31 µg/kg de matéria seca. Há porém concentrações mais elevadas que esta última. Eschke (citado em Plassche e Balk, 1997) encontrou concentrações de HHCB entre os 150 e 300 µg/kg de matéria seca, derivadas da vasta poluição do rio em estudo. Na Tabela 5 constam as concentrações de HHCB em sedimentos determinadas em estudos anteriores.

O coeficiente de partilha octanol/água, K_{ow} , é um indicador importante para estimar a absorção de substâncias hidrofóbicas em matéria orgânica. Assim, os *musks* policíclicos não-polares são mais propícios a não se dissolverem em água devido aos seus elevados valores de K_{ow} .

Fooker *et al.*, 1997, analisou várias amostras de matéria suspensa no Rio Elba (Alemanha). Os níveis máximos de HHCB encontrados rondaram as 13.7 mg/kg de matéria seca, enquanto que a concentração mínima obtida foi de 50 µg/kg de matéria seca.

A absorção do HHCB em lamas é elevada devido à natureza lipofílica do mesmo. Elevadas concentrações de fragrâncias são encontradas em estações de tratamento de águas residuais que recebem as redes de esgoto provenientes de lares domésticos. Blok e Omegam, 1997, estimaram que 45% de HHCB é removido nas ETAR. Na Holanda, estes autores encontraram

concentrações de HHCB variando entre 4.4 e 63.0 mg/kg de matéria seca. Na Tabela 6 constam algumas concentrações de HHCB determinadas em estudos anteriores efetuados em lamas.

Tabela 5 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em sedimentos (µg/kg ms).

Localização	Mét. Analítico	n ^a	C (sedimentos)	LD	LQ	Referência
Áustria	GCMS	1	67 - 120	25	50	Clara <i>et al.</i> , 2011
Alemanha	GCMS	59	20 - 920	0.03	-	Fromme <i>et al.</i> , 2001
Alemanha	GCMS	2	75 - 160 ^b	-	-	Gatermann <i>et al.</i> , 2002
China	GCMS	13	1.5 - 32.3	0.25	-	Hu <i>et al.</i> , 2011
E. U. A.	GCMS	-	0.3 - 3.3	0.15	-	Peck <i>et al.</i> , 2006
Taiwan	GCMS	3	0.2 - 4.0	0.04	0.1	Wu e Ding, 2010
China	GCMS	8	3 - 78	0.5	1	Zhang <i>et al.</i> , 2008

GCMS - Gas chromatography-mass spectrometry.

^a número de amostras.

^b massa húmida.

- sem dados.

Tabela 6 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em lamas (mg/kg ms).

Localização	Mét. Analítico	n ^a	C (lamas)	LD	LQ	Referência
Canadá	GCMS	34	6.79	-	0.002 ^b	Yang e Metcalf, 2006
Alemanha	GCMS	-	3.0	-	0.005	Bester, 2004
Alemanha	GCMS	50 g	4.8 ^b	-	-	Gatermann <i>et al.</i> , 2002
China	GCMS	4	540	-	-	Chen <i>et al.</i> , 2007
Coreia do Sul	GCMS	-	0.52 - 82	0.007	0.02	Guo <i>et al.</i> , 2010
Suíça	GCMS	24	2.3 - 12.2	-	-	Herren e Berset, 2000
China	GCMS	12	0.3 - 12.6	0.003	-	Hu <i>et al.</i> , 2011
Suíça	GCMS	16	20.3	0.015	0.045	Kupper <i>et al.</i> , 2004
E. U. A.	GCMS	6	0.093	-	-	Peck <i>et al.</i> , 2007
E. U. A.	GCMS	10	7.2 - 108	-	0.02	Reiner <i>et al.</i> , 2007
Taiwan	GCMS	2	0.0028	0.04 × 10 ⁻³	0.1 × 10 ⁻³	Wu e Ding, 2010
China	GCMS	3	5.4 - 21.2	-	-	Zeng <i>et al.</i> , 2005
China	GCMS	-	0.3 - 8.4	-	-	Zeng <i>et al.</i> , 2012

GCMS - Gas chromatography-mass spectrometry.

^a número de amostras.

^b massa húmida.

- sem dados.

As lamas de ETAR de zonas industriais têm concentrações de HHCB de duas a três ordens de grandeza inferiores (Fooker *et al.*, 1997), corroborando que os esgotos domésticos são as principais fontes de *musks* policíclicos em lamas. Contudo, a redução de *musks* azotados pode ocorrer devido a processos de digestão e o mesmo pode ocorrer com o galaxolide e restantes *musks* policíclicos (Gatermann *et al.*, 1998).

2.4.2 Águas

Num estudo alemão (Heberer *et al.*, 1999, citado em Rimkus, 1999), as maiores concentrações de HHCB foram encontradas em afluentes e efluentes diretos de estações de tratamento de águas residuais. As concentrações máximas e mínimas de HHCB variam na ordem das $\mu\text{g/L}$, sendo $12.5 \mu\text{g/L}$ a concentração máxima de HHCB encontrada. Contudo, Bester *et al.* (1998) quantificou em águas marítimas (Mar do Norte) concentrações de HHCB e AHTN na grandeza dos ng/L . Rimkus menciona que estes valores são indicativos visto que se deve ter em conta as condições climatéricas e os períodos de precipitação anuais de modo a os resultados serem representativos. A Tabela 7 apresenta as concentrações de HHCB detetadas em águas residuais.

A grandeza de concentrações dá uma estimativa acerca do principal meio de contaminação de ambientes aquáticos por *musks* policíclicos. Num estudo chinês realizado a águas residuais de uma indústria de cosméticos (Chen *et al.*, 2007), obtiveram-se concentrações de $32 \mu\text{g/L}$ e $550 \mu\text{g/L}$ em efluentes e afluentes, respetivamente. As concentrações medidas foram muito altas sugerindo mais uma vez que o fabrico e o uso de produtos de limpeza doméstica e de higiene pessoal são a principal fonte de poluição ambiental por *musks* policíclicos.

Tabela 7 - Concentrações (C), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de HHCB em águas residuais (µg/L).

Localização	Mét. Analítico	n ^a	C (afluentes)	C (efluentes)	LD	LQ	Referência
Alemanha	-	-	-	12.5			Heberer <i>et al.</i> , 1999
Canadá	GCMS	42	0.39	0.17	-	0.4×10^{-3}	Yang e Metcalf, 2006
Alemanha	GCMS	11	1.9	0.7	-	0.1	Bester, 2004
Áustria	GCMS	14	1.4 - 13	1.1	0.02	0.04	Clara <i>et al.</i> , 2011
Alemanha	GCMS	30	-	6.65	0.02		Fromme <i>et al.</i> , 2001
Alemanha	GCMS	2	3.6	1.7	-	-	Gatermann <i>et al.</i> , 2002
Espanha	GCMS	5	0.9 - 3.6	0.7 - 3.0	-	0.08	Arbulu <i>et al.</i> , 2011
China	GCMS	2	550	32	120	-	Chen <i>et al.</i> , 2007
Espanha	GCMS	-	-	0.19	0.02×10^{-3}	0.06×10^{-3}	Gómez <i>et al.</i> , 2011
China	GCMS	45	0.03 - 3.0	0.03 - 0.7	1.2×10^{-3}	-	Hu <i>et al.</i> , 2011
Canadá	GCMS	36	2.03	0.75	0.012	-	Lishman <i>et al.</i> , 2006
Espanha	GCMS	3	0.48 - 2.07	0.23 - 1.43	0.3×10^{-3}	1.0×10^{-3}	Ramírez <i>et al.</i> , 2011
E. U. A.	GCMS	10	1.8 - 12.7	2.4 - 3.7	-	0.01	Reiner <i>et al.</i> , 2007
China	GCMS	4	1.47 - 3.43	0.23 - 0.34	2×10^{-3}	4×10^{-3}	Zhang <i>et al.</i> , 2008

GCMS - Gas chromatography-mass spectrometry.

^a número de amostras.

- sem dados.

Neste trabalho pretende-se desenvolver e validar uma metodologia de análise que tenha capacidade de detecção do galaxolide, nas diferentes matrizes (solos, sedimentos, lamas, casca de pinheiro, composto e águas residuais). De acordo com a literatura consultada (Tabela 8) existem poucos estudos de abarcam a detecção de HHCB em solos. Num estudo canadiano, a extração foi adaptada para cada tipo de amostra, nomeadamente, *accelerated solvent extraction* (ASE) para amostra de sedimentos e lamas, extração líquido-líquido (LLE) para amostra de águas residuais de uma ETAR e a detecção foi realizada por GCMS (Yang e Metcalf, 2006). A extração com *Soxhlet* é mais utilizada em amostras ambientais mais complexas, como sedimentos (Hu *et al.*, 2011) e lamas ativadas (Chen *et al.*, 2007). Uma outra técnica que aparenta ser adequada para a extração dos *musks* é a SPE, dado o elevado log K_{ow} destes compostos. A SPE tem sido utilizada em estudos de análise de fragrâncias em águas residuais (Reiner *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Clara *et al.*, 2011), sedimentos e lamas (Kupper *et al.*, 2004; Peck *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2011). Contudo, a extração de *musks* pelas técnicas

descritas anteriormente pode revelar-se muito morosa e, nalguns casos, tem elevado gasto de solventes. Deste modo, o ideal será usar um método que seja rápido, fácil, com um gasto mínimo de reagentes e permita alguma seletividade de forma a evitar procedimentos de *clean-up* complicados. Por conseguinte, adotou-se uma técnica desenvolvida para a análise de HHCB, baseado na extração da matriz numa fase sólida dispersa (Correia *et al.*, 2013). Este método foi denominado de QuEChERS, dado que é rápido (*Quick*), simples (*Easy*), económico (*Cheap*), eficaz (*Effective*), robusto (*Rugged*) e seguro (*Safe*), e engloba genericamente três fases:

- extração com agitação da amostra e um solvente (acetonitrilo) em vortex;
- secagem e partição, onde se utilizam sais como o sulfato de magnésio, $MgSO_4$, e o cloreto de sódio ou o acetato de sódio, que permitem remover água e fixar os analitos na fase orgânica (diminuem a sua afinidade para a fase aquosa);
- extração dispersiva em fase sólida para o *clean-up*, onde se utiliza uma mistura de sorbentes composta por $MgSO_4$ (para retirar água residual) e por um outro sorbente como: PSA, um polímero com grupos amina primária e secundária que permite a remoção de açúcares, ácidos gordos, ácidos orgânicos e pigmentos; ou ainda C18 que faz a limpeza de lípidos e outros compostos apolares.

Relativamente à deteção, a cromatografia gasosa e espetrometria de massa (GCMS) tem vindo a mostrar-se um método muito versátil e amplamente usado na identificação e confirmação de análise de *musks* (Fromme *et al.*, 2001; Gatermann *et al.*, 2002; Peck *et al.*, 2006; Yang e Metcalf, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Arbulu *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2012; Aguirre *et al.*, 2014). A técnica de HPLC tem sido pouco aplicada na deteção de *musks*. Com base no estudo já efetuado por Correia *et al.* (2013), a metodologia QuEChERS já foi otimizada para a deteção de HHCB em produtos de higiene e cuidado pessoal por HPLC-FL. Pretende-se neste trabalho alargar o estudo à análise de HHCB nas matrizes ambientais (solos, sedimentos, lamas, casca de pinheiro, composto e águas residuais).

Tabela 8 - Métodos de extração, detecção e dados de validação do HHCB em estudos preliminares.

Matriz	Mét. Extração	Mét. Cromatográfico	Recuperação (%)	Precisão (%)	LD/LQ	Ref.
Solo	ASE	GCMS	80	-	LQ: 0.2 - 1.9 µg/kg ^a	Yang e Metcalf, 2006
	SBSE	GCMS	-	7	LD: 0.01 - 1.1 µg/kg	Aguirre <i>et al.</i> , 2014
Sedimento	SPE	GCMS	-	-	LD: 25 µg/kg	Clara <i>et al.</i> , 2011
					LQ: 50 µg/kg	
	SDE	GCMS	83	-	LD: 0.03 µg/kg	Fromme <i>et al.</i> , 2001
	Soxhlet	GCMS	63	-	-	Hu <i>et al.</i> , 2011
	Soxhlet	GCMS	63	-	LD: 0.15 µg/kg	Peck <i>et al.</i> , 2006
	MA-HS-SPME	GCMS-SIM	81 - 88	14	LD: 0.04 µg/kg	Wu e Ding, 2010
					LQ: 0.1 µg/kg	
	Soxhlet	GCMS	-	-	LD: 0.5 µg/kg	Zhang <i>et al.</i> , 2008
					LQ: 1 µg/kg	
					LQ: 0.002 mg/kg ^a	Yang e Metcalf, 2006
Lama	ASE	GCMS	80	-		
	Soxhlet	GCMS	100	-	LQ: 0.005 mg/kg	Bester, 2004
	Soxhlet	GCMS	81	-	-	Chen <i>et al.</i> , 2007
	ASE	GCMS	97	-	LD: 0.007 mg/kg	Guo <i>et al.</i> , 2010
					LQ: 0.02 mg/kg	
	SPE	HRGC-MS/MS	-	-	LD: 100 ng/L	Herren e Berset, 2000
	SPE	GCMS	84 - 105	-	LD: 0.003 mg/kg	Hu <i>et al.</i> , 2011
	SPE	HRGC-MS	79	-	LD: 0.015 mg/kg	Kupper <i>et al.</i> , 2004
					LQ: 0.045 mg/kg	
	SPE	GCMS	90	4.3	LD: 0.015 mg/kg	Peck <i>et al.</i> , 2007
Água					LQ: 0.045 mg/kg	
	Soxhlet	GCMS	87	-	LQ: 0.02 mg/kg	Reiner <i>et al.</i> , 2007
	MA-HS-SPME	GCMS-SIM	83 - 87	-	LD: 0.04 µg/kg	Wu e Ding, 2010
					LQ: 0.1 µg/kg	
	Soxhlet	GCMS	82	-	LD: 0.1 mg/mL	Zeng <i>et al.</i> , 2005
	LLE	GCMS	80	-	LQ: 0.4 × 10 ⁻³ µg/L	Yang e Metcalf, 2006
	LLE	GCMS	75	-	LQ: 0.1 µg/L	Bester, 2004
	LLE	GCMS	-	-	LD: 0.02 µg/L	Clara <i>et al.</i> , 2011
					LQ: 0.04 µg/L	
	SDE	GCMS	87	-	LD: 0.02 µg/L	Fromme, 2001
	SBSE	GCMS	-	-	LQ: 0.08 µg/L	Arbulu <i>et al.</i> , 2011
	SPE	GCMS	81	-	LD: 120 µg/L	Chen <i>et al.</i> , 2007
	SBSE	GC×GC-TOF-MS	161	24	LD: 0.02 × 10 ⁻³ µg/L	Gómez <i>et al.</i> , 2011
					LQ: 0.06 × 10 ⁻³ µg/L	
	SPE	GCMS	-	-	LD: 1.2 × 10 ⁻³ µg/L	Hu <i>et al.</i> , 2011
	LLE	GCMS	87	-	LD: 0.012 µg/L	Lishman <i>et al.</i> , 2006
	SBSE	TD-GCMS	93	10	LD: 0.3 × 10 ⁻³ µg/L	Ramirez <i>et al.</i> , 2011
					LQ: 1.0 × 10 ⁻³ µg/L	
	LLE	GCMS	87	-	LQ: 0.01 µg/L	Reiner <i>et al.</i> , 2007
	SPE	GCMS	78	-	LD: 2 × 10 ⁻³ µg/L	Zhang <i>et al.</i> , 2008
					LQ: 4 × 10 ⁻³ µg/L	

ASE: accelerated solvent extraction; SBSE: stir-bar sorptive extraction; TD-GCMS: thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry; SPE: solid-phase extraction; SDE: simultaneous steam-distillation/solvent extraction; MA-HS-SPME: microwave-assisted headspace solid-phase microextraction; SIM: selected ion monitoring; HRGC-MS/MS: high-resolution gas chromatography and ion-trap MS/MS; LLE: liquid-liquid extraction; GC×GC-TOF-MS: two-dimensional gas chrom.-time-of-flight mass spect.

- sem dados.

^a - massa húmida.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Padrões e reagentes

O HHCB diluído a 50% em dietilftalato (DEP) foi adquirido à SAFC (St. Louis, EUA). Para a preparação da solução *stock* usou-se etanol (grau *pro-analysis*, Riedel-de Haën, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Hanover, Alemanha). O solvente utilizado para extração foi o acetonitrilo (ACN) para HPLC isocrático (VWR International, Pennsylvania, EUA). Usou-se também água destilada e desionizada do laboratório.

A fase móvel utilizada na análise por HPLC foi preparada com acetonitrilo e água destilada (80:20), acidificada com ácido acético glacial (100%, grau *pro-analysis*, Pronalab, Tlalnepantla, México).

Os sais e sorbentes utilizados para a extração, denominados de QuEChERS, foram adquiridos à UCT (Bristol, UK): ECMSSA-MP (6000 mg de sulfato de magnésio, $MgSO_4$, e 1500 mg de acetato de sódio, $NaCH_3COO$) e ECMPSC1815C (900 mg de $MgSO_4$, 300 mg de PSA, um polímero com grupos funcionais amina primária e secundária, e 150 mg de octadecilsilano, C18).

3.1.2 Equipamento cromatográfico

Para análise das amostras utilizou-se um cromatógrafo líquido (HPLC-FL) Merck-Hitachi® L6200A Intelligent Pump (Figura 5) e um detetor por fluorescência Merck-Hitachi® F-1080 Fluorescence Detector, equipados com uma coluna de adsorção Merck LiChroCART® 250-4 - LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm).

3.1.3 Plano de Amostragem

Para validação do método foram usados:

- solos recolhidos no jardim da FEUP (SOL-FEUP) (50 g);
- sedimentos recolhidos no Porto de Leixões provenientes de estudos preliminares da FEUP (SED-LEIX).

Para testar a aplicabilidade a outras matrizes usaram-se amostras provenientes da ETAR de Parada (Maia), recolhidas a 10 de Maio de 2013:

- solos das margens do Rio Leça, contíguas à estação (SOL-ETAR) (2 kg) (Figura 3);
- águas residuais à entrada (AFL) e à saída (EFL) da ETAR (500 mL) (Figura 4);
- lamas desidratadas (LAM) (2 kg) (Figura 4).

Posteriormente, após reunião com responsável da ETAR, verificou-se o interesse em analisar subprodutos derivados das lamas para aplicação agrícola:

- casca de pinheiro (adquirida externamente pela ETAR para incorporar no composto) (CASCA) (500 g);
- composto (lama misturada com casca de pinheiro) (COMP) (500 g) (Figura 3).



Figura 3 - Vista aérea da ETAR (1: SOL-ETAR; 2: COMP). Fonte: www.google.pt/maps

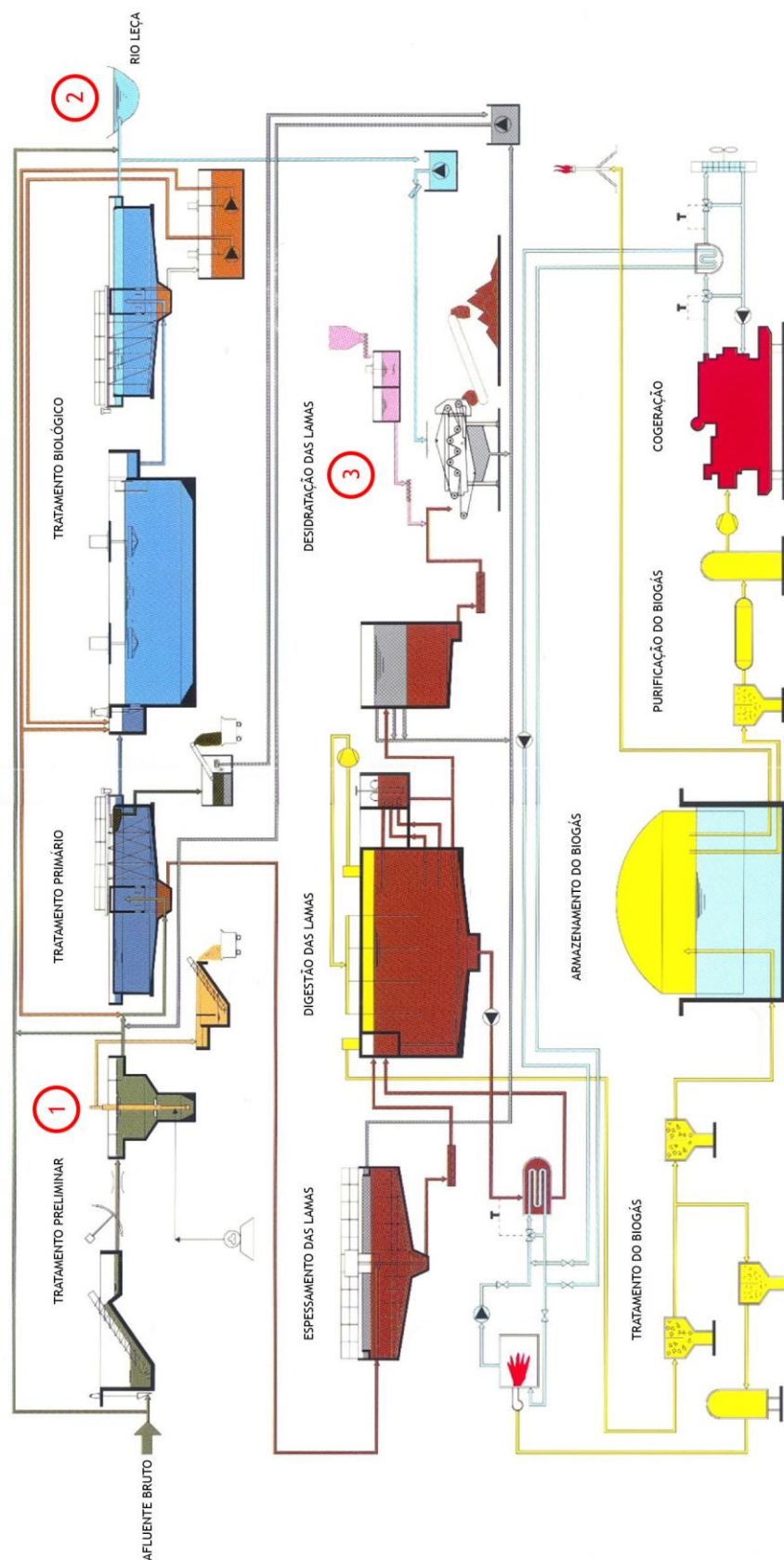


Figura 4 - Flowsheet da ETAR. 1: AFL; 2: EFL; 3: LAM. (CMM, 2002)

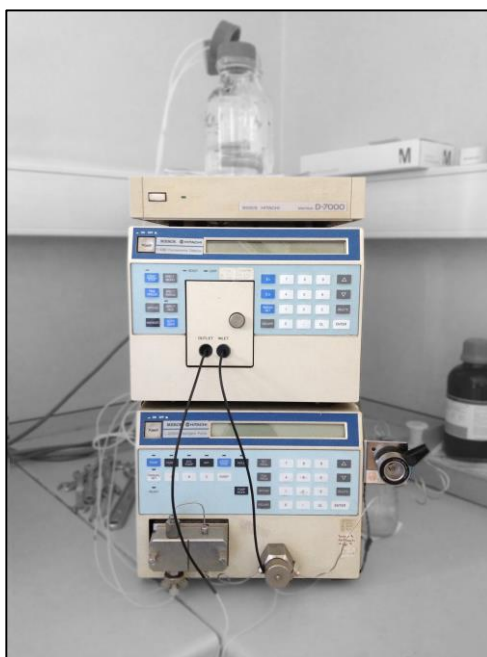


Figura 5 - HPLC com detetor por fluorescência.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação dos padrões analíticos

Preparou-se uma solução *stock* com 70 mg_{HHCB}/L em etanol, cuja estabilidade foi estudada previamente (Correia *et al.*, 2013), assim como uma solução de trabalho com 200 µg_{HHCB}/L em fase móvel a partir da anterior e ambas foram armazenadas no escuro a 4 °C. Esta última solução foi usada diariamente como padrão de controlo na análise cromatográfica, bem como para a preparação dos padrões usados na calibração anteriormente realizada no laboratório (Correia *et al.*, 2013). Foram ainda preparadas duas soluções padrão com 4.6 e 460 µg_{HHCB}/L em acetonitrilo para os ensaios de exatidão.

Devido à difusão do uso de *musks* policíclicos em PHCP, foi necessário cuidado para evitar a contaminação durante a preparação dos padrões e da execução da análise. Para minimizar a contaminação, foram usadas luvas e não foram empregados sabonetes nem cremes.

3.2.2 Preparação de amostras sólidas

As amostras sólidas foram previamente secas e trituradas antes do processo de extração. A amostra SOL-FEUP foi seca em excicador durante 2 semanas. Após estabilização da sua massa, a amostra foi triturada em almofariz. Os sedimentos existentes em laboratório (SED-LEIX)

encontravam-se secos (*hotte*, à temperatura ambiente) por parte de estudos preliminares e foram triturados. Em relação às amostras provenientes da ETAR todas elas sofreram secagem em tabuleiro dentro da *hotte* durante duas semanas e à temperatura ambiente. SED-LEIX, LAM, SOL- ETAR, CASCA e COMP foram trituradas em almofariz e tamisadas ($d_{\text{partícula}} \leq 500 \mu\text{m}$) (Retsch AS 200 digit).

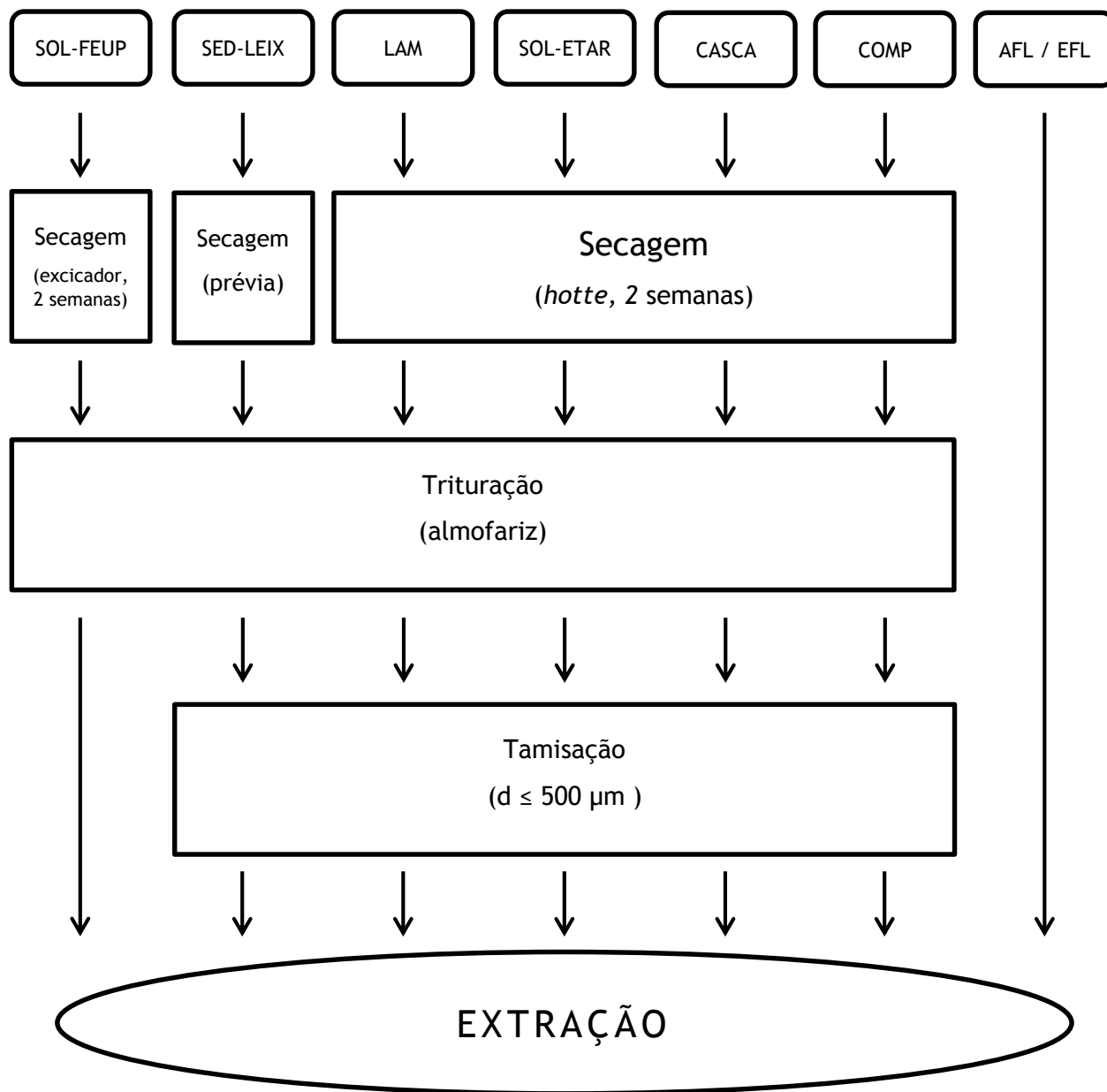


Figura 6 - Esquema representativo do método de preparação de amostras.

3.2.3 Procedimento de extração

O método de extração foi adaptado de um estudo anterior desenvolvido para extração de pesticidas em frutas e vegetais (Anastassiades e Lehotay, 2003).

O procedimento de extração desenvolvido foi o seguinte:

- Trituraram-se as amostras sólidas previamente em almofariz e se seguida foram rigorosamente pesadas (2 g) diretamente num tubo de polipropileno (PP) com fundo cónico (*Falcon*, 50 mL). Em amostras líquidas foram medidos 5 mL em tubo de PP;
- Adicionou-se acetonitrilo (15 mL) como solvente de extração;
- Para os ensaios de exatidão (avaliação da percentagem de recuperação após adição de padrão) adicionaram-se 20, 50 ou 100 µL de solução com 4.6 µg_{HHCb}/L (ou 460 µg_{HHCb}/L quando conveniente);
- Agitou-se em vortex durante 3 minutos e colocou-se a mistura em banho de ultrassons (P-Selecta) durante 10 minutos. O primeiro passo da extração, que inclui secagem e partição, foi realizado com a mistura de sais QuEChERS (ECMSSA-MP) adicionada e imediatamente agitada no tubo de PP durante 3 minutos para evitar a formação de aglomerados;
- Seguiu-se a centrifugação a 3700 rpm durante 10 minutos (Hettich Zentrifugen Rotofix 32 A), que permitiu a separação total das fases. O sobrenadante resultante foi transferido para um tubo de PP (50 mL) com os sorbentes QuEChERS adequados (ECMPSC1815C) e agitado em vortex por 3 minutos, o que permitiu efetuar o *clean-up* por extração em fase sólida dispersa;
- Procedeu-se à centrifugação (3700 rpm, 10 minutos) e o sobrenadante resultante foi transferido para um tubo de PP (15 mL). Nos casos em que a análise cromatográfica não foi efetuada de imediato, o extrato foi armazenado numa arca frigorífica (-18 °C). Todas as amostras foram previamente filtradas ($d_{\text{poro}} = 5 \mu\text{m}$) e extraídas pelo menos duas vezes para a quantificação e duas vezes para os testes de recuperação. Na Figura 7 está representado um esquema resumindo o método de extração por QuEChERS.



Figura 7 - Esquema representativo do método de extração por QuEChERS.

3.2.4 Análise cromatográfica

No trabalho desenvolvido no âmbito deste projeto, implementou-se um método de análise do HHCB por HPLC-FL, partindo do método analítico descrito noutro estudo (Correia *et al.*, 2013):

Condições de análise:

- Fase estacionária: Merck LiChroCART® 250-4 - LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm);
- Fase móvel: 20% de água e 80% de acetonitrilo com 0.76 g/L de ácido acético;
- Caudal: 1 mL/min;
- Comprimentos de onda (λ): $\lambda_{\text{excitação}}$ 280 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 310 nm;
- Volume de injeção: 120 µL;
- Tempo de análise: 15 minutos.

4 Resultados e Discussão

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que é adequado para a sua finalidade pretendida. De um modo geral, a validação abarca três tipos de parâmetros (Alves, 2013):

- Parâmetros de *caraterização*, que nos dizem qual a finalidade do método (especificidade) e que tipo de interferentes poderão afetar o resultado (praticabilidade);
- Parâmetros de *quantificação*, englobando a linearidade e os parâmetros estatísticos associados (declive, ordenada na origem e coeficiente de correlação), assim como a sensibilidade e os limites de detecção e de quantificação;
- Parâmetros de *fiabilidade* do método, que verificam se o método conduz aos resultados esperados, englobando a precisão e a exatidão.

Estes parâmetros correspondem ao conceito de *fit-for-purpose*, em que não se pretende obter o melhor limite de detecção possível, a melhor precisão e melhor exatidão, mas antes verificar que estes critérios contribuem para uma incerteza global que se adequa aos fins em vista.

O estudo de validação do método analítico para a detecção de HHCB em matrizes ambientais assentou no limite de detecção, limite de quantificação, da precisão e da exatidão.

4.1 Validação do método

A parte experimental deste trabalho iniciou-se com a aprendizagem da técnica de extração por QuEChERS, bem como da utilização do HPLC-FL. Para o efeito preparou-se o padrão 200 $\mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{L}$ referido anteriormente partindo da solução *stock*. Realizaram-se ensaios com injeção direta do padrão para determinar o pico cromatográfico do HHCB e verificou-se que o seu tempo de retenção tinha uma média de 13.5 ± 0.4 min (Figura 8).

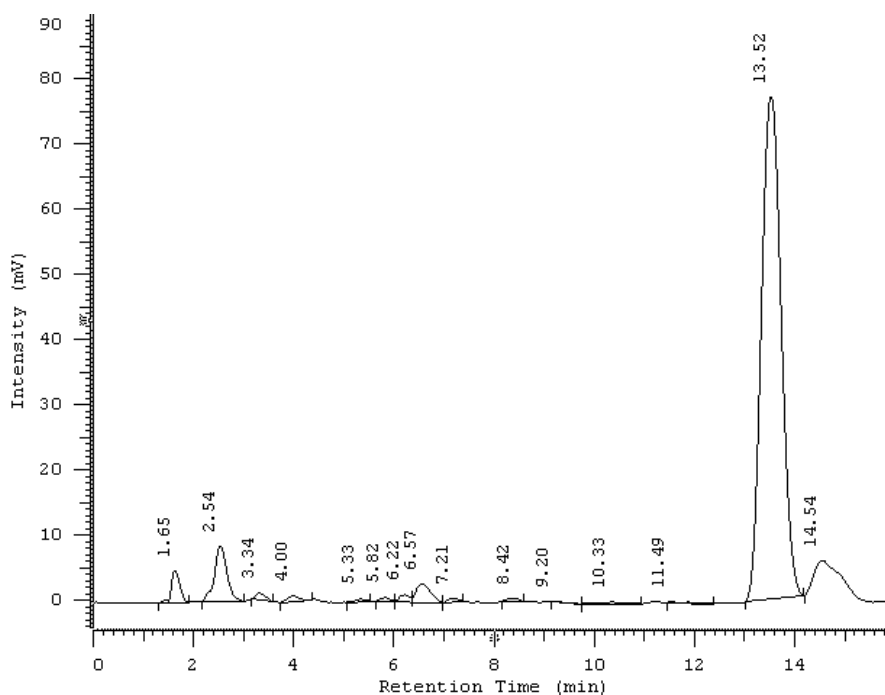


Figura 8 - Cromatograma de uma solução padrão de galaxolide (200 $\mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{L}$).

Como este padrão de controlo era injetado diariamente, traçou-se um gráfico (ou carta) de controlo de Shewhart para avaliar o desempenho do método analítico.

Cartas de controlo de Shewhart são gráficos que mostram a variação da grandeza ou característica de interesse em função do tempo para avaliar atributos ou desempenho de métodos ou de instrumentos de medição (Human *et al.*, 2010). Estes gráficos (Figura 9) determinam estatisticamente uma faixa denominada limite de controlo, que é limitada por uma linha superior (limite superior de controlo - LSC), uma linha inferior (limite inferior de controlo - LIC), e uma linha central (limite central - LC).

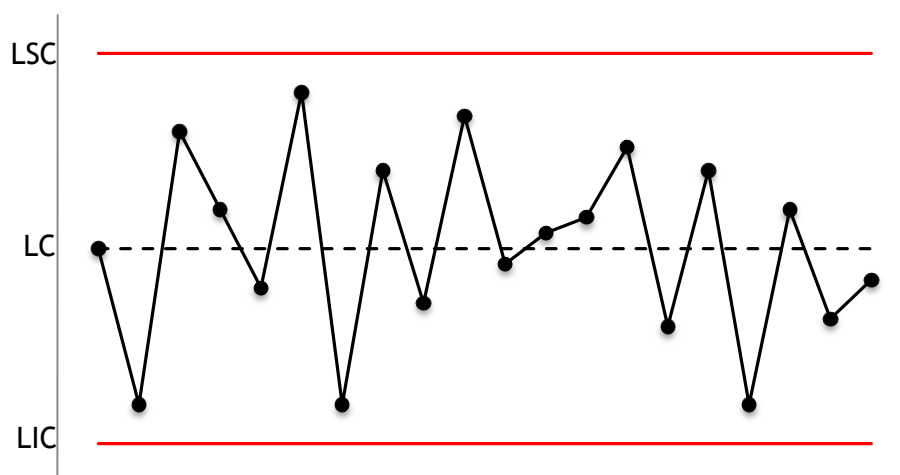


Figura 9 - Exemplo de uma carta de controle de Shewhart.

A carta de controle de Shewhart é um elemento muito importante pois tem por objetivos: mostrar evidências que um processo está a operar sob controle estatístico; detetar a presença de causas especiais de variação; monitorizar e aprimorar o desempenho do processo de medição.

Os limites de controle (ou de rejeição) nas cartas de Shewhart são definidos por uma linha $\bar{x} \pm 3s$ acima ou abaixo do limite central (\bar{x}). Muitas vezes é vantajoso construir o gráfico juntamente com as linhas $\bar{x} \pm 2s$, que são chamadas de limites de aviso. Podem ser inseridos ainda os limites $\bar{x} \pm 1s$, formando três regiões na carta de controle que auxiliam na detecção de alguns padrões.

Vários critérios para a interpretação das cartas de controle podem ser aplicados simultaneamente para determinar se o processo está sob controle. O critério básico é o de que haja um ou mais pontos fora dos limites de controle. Critérios suplementares são utilizados para aumentar a sensibilidade das cartas de controle a uma pequena alteração no processo, de modo a responder mais rapidamente a uma variação. A norma ISO 8258 (*Shewhart Control Charts*) estabelece os seguintes critérios de decisão em cartas de controle (Figura 10):

- a) 1 ou mais pontos acima do LSC ou abaixo do LIC;
- b) 9 pontos consecutivos na zona C ou no mesmo lado do LC;
- c) 6 pontos consecutivos, todos aumentando ou todos diminuindo;
- d) 14 pontos consecutivos alternando para cima e para baixo;
- e) 2 de 3 pontos consecutivos na zona A ou fora dela;
- f) 4 de 5 pontos consecutivos na zona B ou fora dela;

- g) 15 pontos consecutivos na zona C (tanto acima quanto abaixo do LC);
- h) 8 pontos consecutivos na zona B.

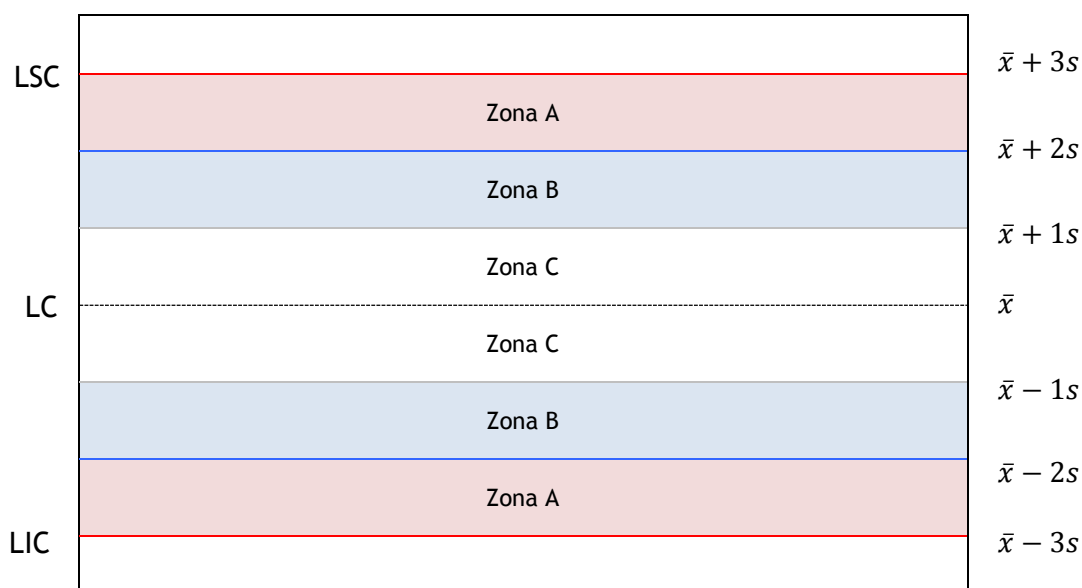


Figura 10 - Carta de controlo com os limites superior (LSC), inferior (LIC) e central (LC) e linhas correspondentes aos desvios padrão.

Os gráficos de controlo são ferramentas estatísticas muito simples de construir e de utilizar, e muito úteis para controlar a estabilidade de um processo analítico.

Na Figura 11 pode-se observar a carta de controlo traçada para 46 injeções diárias do padrão. No âmbito deste trabalho não foram utilizados os critérios suplementares de controlo. O critério básico foi aplicado, bastando que todos os pontos estivessem abaixo do LSC e acima do LIC e, desse modo, não se rejeitou nenhum valor como se pode constatar na carta.

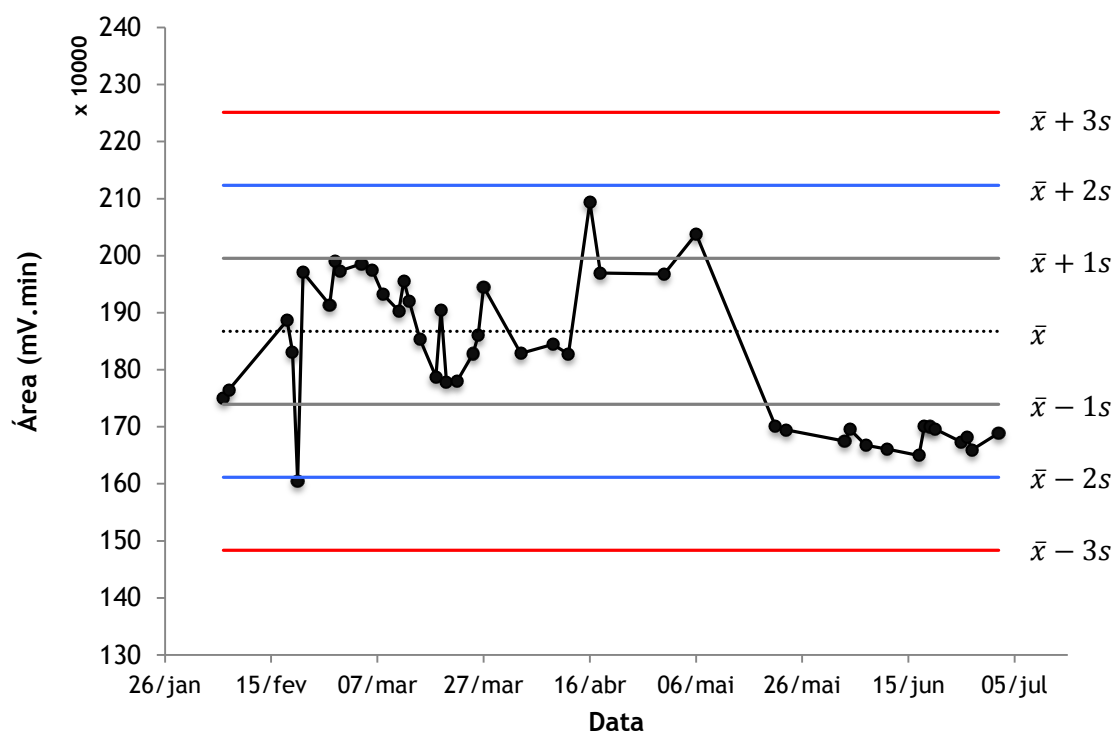


Figura 11 - Carta de controlo referente ao padrão de controlo (200 µg_{HHCB}/L) usado diariamente na análise cromatográfica.

O método descrito anteriormente foi aplicado na determinação de HHCB em seis matrizes ambientais (solos, sedimentos, águas residuais, lamas, casca de pinheiro e composto), visto que os dados relativos à (eco)toxicidade e ocorrência nestas matrizes não são exaustivos. A existência de HHCB pode ser potencialmente perigosa para os ecossistemas ambientais, bem como para a segurança e saúde humana.

Os extratos obtidos pelo método QuEChERS foram filtrados e analisados depois de diluídos adequadamente em fase móvel.

A calibração do método cromatográfico por HPLC-FL, foi feita para uma gama de concentrações de HHCB de 1.000 a 200.400 µg/L ou 0.005 a 1.002 µg/kg de amostra, o que corresponde à gama de linearidade. Os padrões foram preparados com fase móvel, dado que o coeficiente de variação das respostas e a definição dos picos obtidos melhoravam (Correia *et al.*, 2013). A Figura 12 apresenta a reta de calibração obtida e os dados experimentais que conduziram à regressão linear da mesma.

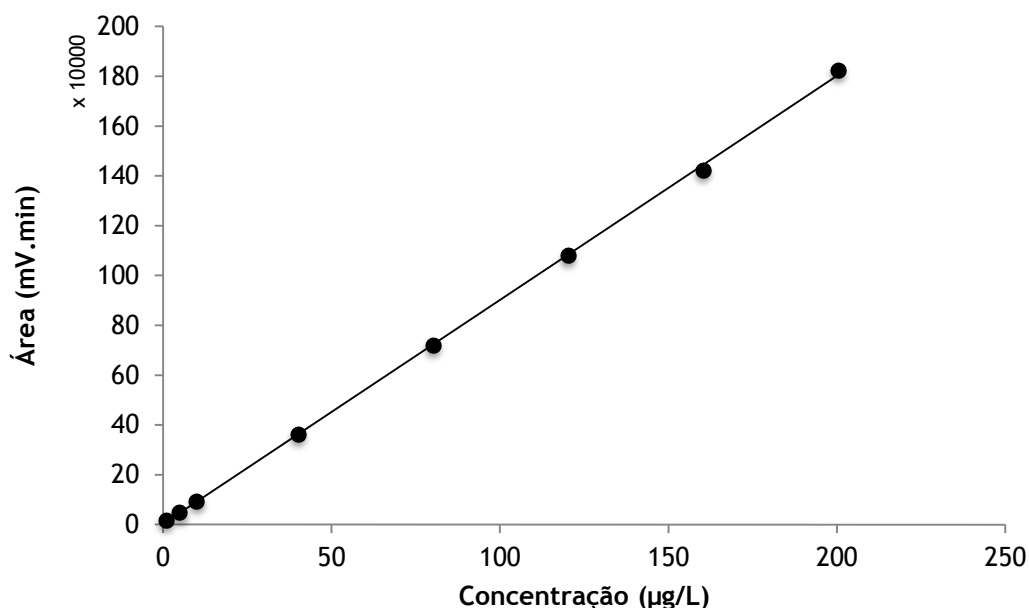


Figura 12 - Reta de calibração de equação $y = 8994.9x + 2165.1$ e $R^2 = 0.9997$ (Correia *et al.*, 2013).

No que respeita aos parâmetros de linearidade e à adequação do método analítico, a curva de calibração obtida teve um coeficiente de correlação adequado ($R^2 = 0.9997$), a raiz da função abarca a ordenada na origem e o declive obtido é elevado (8994.9).

O limite de detecção (LD) médio, calculado tendo por base uma relação sinal/ruído de três vezes, foi de $0.98 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ e de $0.65 \mu\text{g}/\text{L}_{\text{amostra}}$ para matrizes sólidas e líquidas, respetivamente, ao passo que o limite de quantificação (LQ) médio, calculado considerando uma relação sinal/ruído de dez vezes, foi de $3.25 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ e $2.14 \mu\text{g}/\text{L}_{\text{amostra}}$, para matrizes sólidas e líquidas, respetivamente (Tabela 9 e Tabela 10). Estes limites estão abaixo do LD de $25 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ e do LQ de $50 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ do método de extração por SPE e detecção por GCMS em sedimentos (Clara *et al.*, 2011), bem como do LD de $120 \mu\text{g}/\text{L}$ de um estudo chinês em águas residuais de uma fábrica de cosméticos (Chen *et al.*, 2007). Valores semelhantes a este trabalho foram encontrados através do método de SBSE e detecção por TD-GCMS em solos, com um LD na gama de $0.01 - 1.1 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ num estudo espanhol (Aguirre *et al.*, 2014). Apenas um método de SBSE com detecção por GC×GC-TOF-MS em águas conseguiu alcançar limites com ordens de grandeza cinco vezes inferiores a este estudo (Gómez *et al.*, 2011) (Tabela 8). O método proposto adequa-se aos objetivos em vista pois é capaz de detectar concentrações da ordem das referidas na bibliografia.

Tabela 9 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para matrizes sólidas ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{amostra}}$).

Matriz	LD	LQ
SOL-FEUP	0.98	3.25
SOL-ETAR	0.96	3.19
SED-LEIX	0.95	3.16
LAMAS	1.14	3.80
CASCA	0.90	3.00
COMP	0.93	3.09

Tabela 10 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para matrizes líquidas ($\mu\text{g}/\text{L}_{\text{amostra}}$).

Matriz	LD	LQ
AFL	0.64	2.12
EFL	0.65	2.16

A precisão intermédia foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos cromatográficos das amostras. A Tabela 11 resume a concentração de HHCB e precisão intermédia determinadas neste estudo para matrizes sólidas e líquidas. Na matriz SOL-FEUP foram realizadas seis extrações independentes de uma toma de solo colhida num dos jardins da Faculdade de Engenharia e após análise cromatográfica constatou-se a existência de galaxolide (Figura 13). A concentração média conseguida nesta matriz foi de $83.8 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{ms}}$ sendo bastante superior às concentrações de $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Yang e Metcalf, 2006) e $5.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Aguirre *et al.*, 2014) encontradas na literatura (Tabela 4). O CV determinado foi de 15.5%, estando acima de 7% que um estudo espanhol apresenta (Aguirre *et al.*, 2014). A existência de galaxolide neste tipo de solo é plausível de ocorrer uma vez que estes jardins têm sistemas de rega cuja água provém de estações de tratamento residual e como foi dito anteriormente, mais de 50% dos *musks* sintéticos não são degradados nestas estações (Bester, 2004; Ternes *et al.*, 2004), o que pode provocar a recirculação destas substâncias na rede de abastecimento urbano de água. Contrariamente aos solos da faculdade, não foi detetado galaxolide nas duas amostras da matriz SOL-ETAR. A época sazonal abundante em chuvas fortes que galgaram as margens do rio onde foram recolhidas estas amostras, pode ter também uma forte influência na diluição e diminuição da concentração de galaxolide nos afluentes estudados.

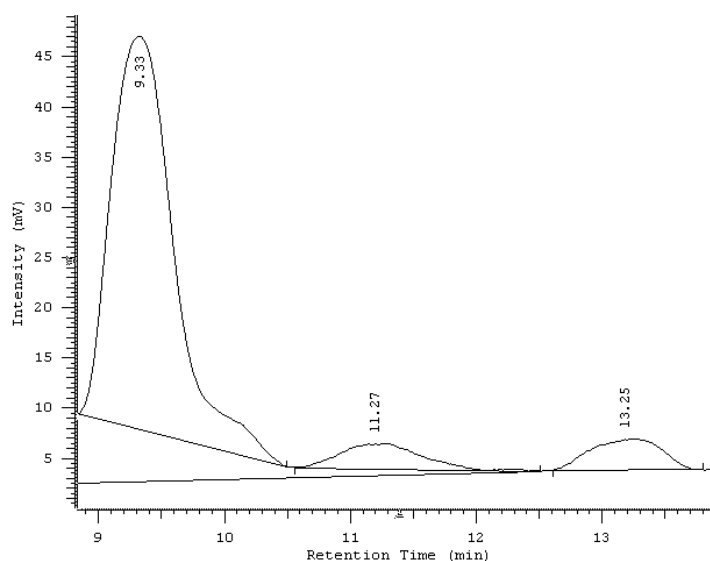


Figura 13 - Cromatograma da matriz SOL-FEUP (83.8 µg_{HHCB}/kg).

Em SED-LEIX realizaram-se quatro extrações e obteve-se uma concentração média de 9.7 µg/kg_{ms} com um CV de 10.9%, inferior a 14% do estudo realizado por Wu e Ding (2010). Esta concentração está dentro da gama encontrada em estudos realizados na China (He *et al.*, 2011 e Zhang *et al.*, 2008), porém foram encontradas concentrações com ordens de grandeza superiores em outros artigos (Tabela 5). O facto de a amostra ter sido retirada duma zona costeira, pode ter influência da diluição do *musk* e posterior absorção no sedimento em estudo.

Na matriz LAMAS, foi obtida uma concentração média de galaxolide de 9.3×10^3 µg/kg_{ms} com um CV de 8.5% (superior a 4.3% obtido por Peck *et al.*, 2007), alcançada em duas extrações. Na literatura foram encontradas concentrações de HHCB superiores particularmente num estudo realizado em lamas de uma zona fabril de cosméticos (Chen *et al.*, 2007) onde são de esperar níveis de concentração de *musks* bastante elevados. Comparando a concentração obtida aqui com aquela obtida no sedimento, a concentração da lama é 3 ordens de grandeza superior. Este resultado não é de refutar uma vez que as lamas são abundantes em matéria orgânica e os *musks* têm natureza lipofílica. Na Figura 14 é apresentado o cromatograma da matriz LAMAS.

O subproduto derivado das lamas, COMP, apresentou uma concentração de 17.6×10^3 µg/kg_{ms} e um CV de 0.8% (Figura 15), obtidos em duas extrações de uma toma de composto. Até então não existem estudos realizados neste tipo de matriz (lama misturada com casca de pinheiro). Comparando a concentração obtida aqui com aquela obtida na lama, a concentração do composto é uma ordem de grandeza superior. Uma vez que este é um subproduto da ETAR,

não era de prever este acréscimo na concentração do mesmo. Como não é sabido se o composto é produzido pela mesma amostra de lama assumiu-se que poderia ter havido efeito de concentração por evaporação da água.

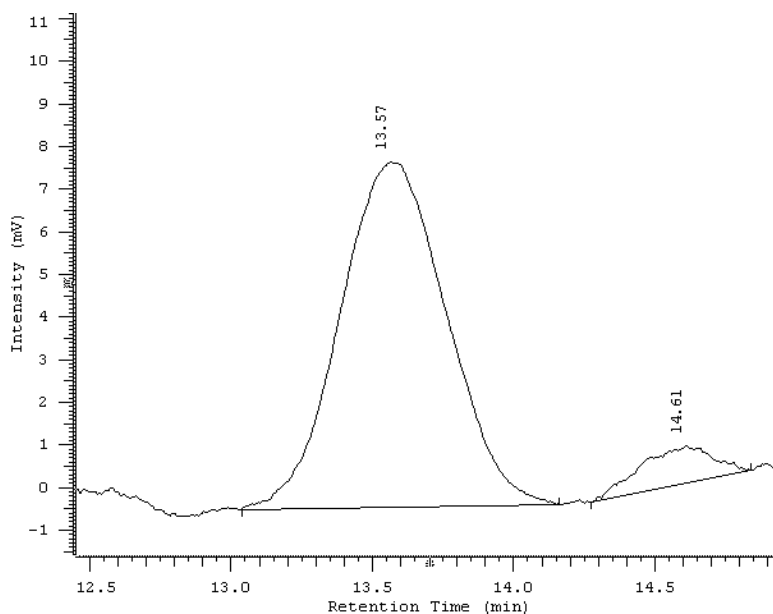


Figura 14 - Cromatograma da matriz LAM ($9.3 \times 10^3 \mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{kg}$).

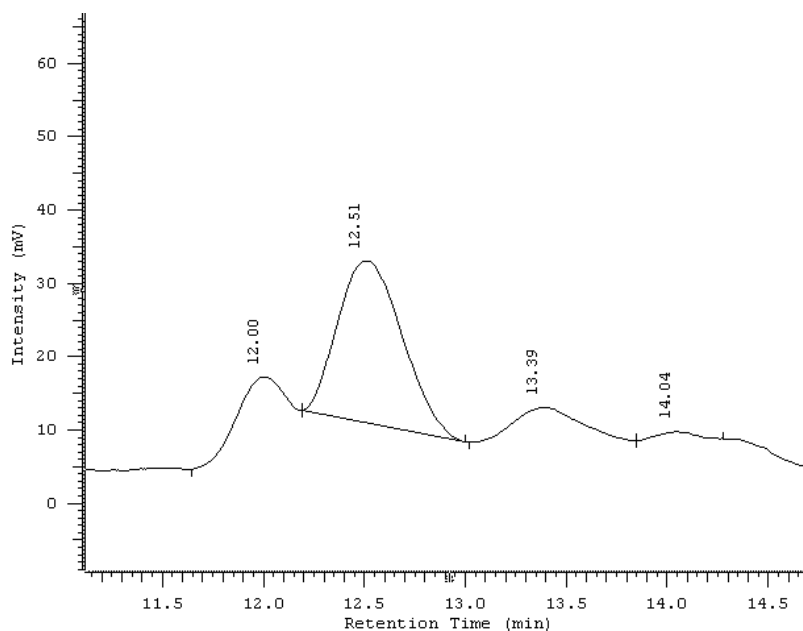


Figura 15 - Cromatograma da matriz COMP ($17.6 \times 10^3 \mu\text{g}_{\text{HHCB}}/\text{kg}$).

Foram analisadas duas extrações independentes da mesma amostra de casca de pinheiro. Foi detetado um pico aos 12 minutos muito semelhante ao pico do HHCB. Para verificar a existência de galaxolide nesta amostra, injetou-se novamente o padrão de HHCB e o tempo

de retenção permanecia nos 13 minutos, logo, a casca de pinheiro não continha HHCB. Como dito atrás, a natureza lipofílica dos *musks* resulta numa forte absorção destes em matéria orgânica (lamas) sendo espetável obter este resultado.

Nas águas residuais não foi possível determinar a precisão intermédia porque não foi detetado galaxolide tanto no afluente como no efluente da ETAR. A época sazonal abundante em chuvas aquando da colheita destas amostras e a localização geográfica da ETAR também poderia ter contribuído para a detecção nula de HHCB neste tipo de matriz. A adição de uma concentração conhecida de galaxolide à água residual permitiria avaliar a precisão intermédia mas, por falta de tempo, tal não foi realizado.

Tabela 11 - Concentração de HHCB em matrizes sólidas e líquidas e respetivas precisões intermédias.

	Matriz	n ^a	Concentração na amostra ^{b,c}	Precisão (CV, %)
Sólidos	SOL-FEUP	6	83.8	15.5
	SOL-ETAR	2	n. d.	-
	SED-LEIX	4	9.7	10.9
	LAM	2	9.3×10^3	8.5
	COMP	2	17.6×10^3	0.8
	CASCA	2	n. d.	-
Águas	AG-DEST	2	n. d.	-
	AFL	2	n. d.	-
	EFL	2	n. d.	-

^a n.º de amostras.

^b µg/kg (amostras sólidas).

^c µg/L (amostras líquidas).

n. d.: não detetável.

- sem dados.

Examinando a Tabela 11 pode-se constatar que a matriz COMP apresenta maior grau de proximidade entre resultados enquanto que SOL-FEUP exhibe valores mais díspares.

A exatidão, avaliada pela percentagem de recuperação, foi determinada em extrações de amostras acrescidas de uma quantidade conhecida de galaxolide (*spike*) a vários níveis de concentração (Tabela 12). Em SOL-FEUP foram adicionados 100, 50 e 20 µL de uma solução padrão de HHCB (460 µg/L) e obtiveram-se recuperações médias de 65%, 64% e 61%, respetivamente.

Na matriz SOL-ETAR, a exatidão foi determinada em extrações de amostras acrescidas com

100 µL de duas soluções padrão de HHCB (460 e 4.6 µg/L) e obteve-se uma recuperação média de 52% e 51%.

Em relação aos sedimentos, a exatidão foi determinada em extrações de amostras acrescidas com 3 *spikes* de uma solução padrão de HHCB (460 µg/L) e outra extração com uma solução padrão de concentração 100 vezes menor, porém não detetável. As recuperações médias rondaram os 54%.

A percentagem de recuperação das lamas provenientes da ETAR foi determinada em duplicados de duas extrações adicionadas com 100 µL de duas soluções padrão de HHCB, 460 e 4.6 µg/L, e obteve-se uma recuperação média de 63% e 93%, respetivamente.

A percentagem de recuperação do composto proveniente da ETAR foi determinada em duplicados de duas extrações adicionadas com 100 µL de duas soluções padrão de HHCB, 460 e 4.6 µg/L. Tanto para a primeira concentração como na segunda, obtiveram-se recuperações muito baixas, cerca de 30% e 11%, respetivamente. A escassez de tempo para realização de novos ensaios não permitiu encontrar um método capaz de extrair e quantificar o galaxolide em composto com parâmetros de validação adequados.

Tal como nas lamas, a percentagem de recuperação da casca de pinheiro proveniente da ETAR foi determinada em duas extrações adicionadas com 100 µL de duas soluções padrão de HHCB, 460 e 4.6 µg/L. Para a primeira concentração obteve-se uma recuperação um pouco reduzida, cerca de 44%. A extração com a solução padrão de menor concentração não teve sucesso visto que o pico do galaxolide não era detetável aos 13 minutos. Para constatar este resultado adicionou-se a solução padrão de HHCB (200 µg/L) e obteve-se um pico aos 13 minutos correspondente à solução padrão adicionada.

Tabela 12 - Concentrações de HHCB em matrizes sólidas e líquidas analisadas neste estudo, e recuperações (%) determinadas para cada nível de *spike* adicionado.

	Matriz	<i>n</i> ^a	Concentração na amostra ^{b,c}	Concentração adicionada ^{b,c}	Exatidão (Rec., %)
Sólos	SOL-FEUP	6	83.8	23	65
				11.5	64
				4.6	61
	SOL-ETAR	2	n. d.	23	52
				0.23	51
	SED-LEIX	4	9.7	23	49
				0.23	n. d.
				11.5	57
				4.6	58
	LAM	2	9.3×10^3	23	63
				0.23	93
	COMP	2	17.6×10^3	23	30
				0.23	11
	CASCA	2	n. d.	23	44
				0.23	n. d.
Águas	AG-DEST	2	n. d.	0.092	78
	AFL	2	n. d.	-	-
	EFL	2	n. d.	-	-

^a n° de amostras.^b µg/kg (amostras sólidas).^c µg/L (amostras líquidas).

n. d.: não detetável.

- sem dados.

Nas águas residuais a percentagem de recuperação foi determinada em duas extrações de água destilada e desionizada acrescidas com 100 µL de uma solução padrão de HHCB (4.6 µg/L) e obteve-se uma recuperação média de 78%. Para evitar falsos positivos fez-se duas extrações da mesma água destilada sem padrão e não se detetou HHCB. Deste modo, o método aplicado mostrou ser capaz de extrair e quantificar o galaxolide em águas com parâmetros de validação adequados. Foi analisada uma amostra de água afluenta da ETAR de Parada e outra amostra de água efluente da mesma ETAR. Apesar das extrações terem sido feitas em duplicado em nenhuma delas se detetou HHCB. Esta ausência de galaxolide pode ser corroborada pelos mesmos factos explicados para SOL-ETAR. A localização do Rio Leça contíguo à estação numa zona pouco urbana e as condições meteorológicas, podem ser a causa de não ter sido detetada esta fragrância.

4.2 Incerteza global do método

A incerteza é um parâmetro que está associado a um resultado de uma medição e que indica a gama de valores que pode ser razoavelmente atribuída a esse resultado. O erro por outro lado, representa a diferença entre o resultado e o valor real para o parâmetro medido. A incerteza de um método tem origem na amostragem, interferências ou efeitos de matriz na amostra, das condições ambientais, do equipamento de medição, dos valores de referência, das aproximações e suposições incorporadas no método e procedimentos de cálculo, assim como em variações aleatórias associadas aos procedimentos (EURACHEM, 2000).

Neste estudo, a incerteza global foi calculada usando o método adotado pela *International Organization for Standardization* (ISO) e adaptado pelo guia EURACHEM/CITAC (Elision *et al.*, 2000). De acordo com esta abordagem, existem quatro princípios de incerteza que devem ser tidos em conta, nomeadamente a incerteza dos padrões analíticos, a incerteza da curva de calibração, a incerteza da precisão e a incerteza da exatidão, tal como descrito em Correia *et al.*, 2013.

A incerteza global varia de 25% a 6% para concentrações desde 0.02 a 1 mg/kg_{amostra} na matriz SOL-FEUP. Nas restantes matrizes (Figura 16) verifica-se um comportamento muito semelhante e apenas para concentrações muito reduzidas (~0.005 mg/kg_{amostra}) a incerteza global é elevada (>100%).

A Tabela 13 apresenta as concentrações de galaxolide detetadas neste estudo com a respetiva incerteza global. Os resultados obtidos são razoáveis. Para LAM e COMP as incertezas globais são muito pequenas visto que as concentrações de HHCB são elevadas. Para SED-LEIX a incerteza não é adequada (46%) uma vez que, para concentrações mais baixas a incerteza tende a aumentar, tal como enunciado anteriormente.

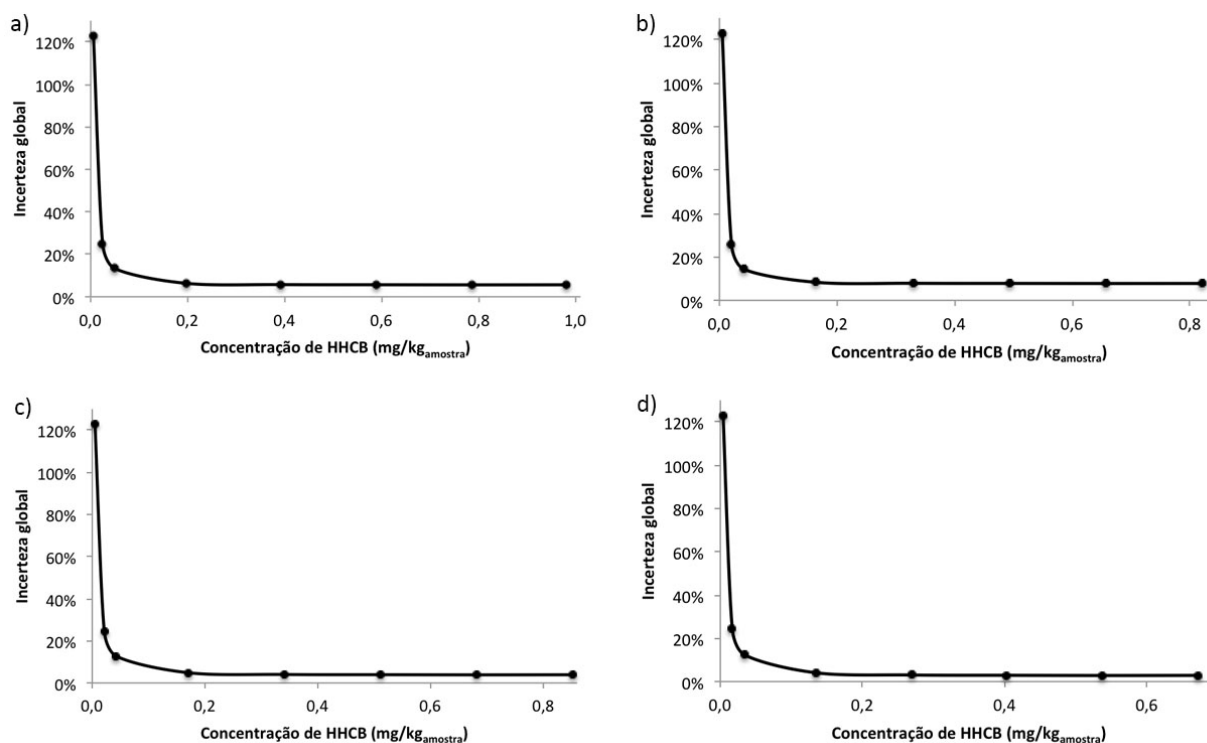


Figura 16 - Incerteza global (%) do método associado à concentração de galaxolide (mg/kg_{amostra}) em (a) SOL-FEUP, (b) SED-LEIX, (c) LAM, (d) COMP.

Tabela 13 - Concentração de galaxolide encontrada em cada matriz e respectiva incerteza global.

Matriz	Concentração de HHCB (µg/kg)
SOL-FEUP	83.8 ± 12.9
SED-LEIX	9.7 ± 4.5
LAM	$(9.3 \pm 0.05) \times 10^3$
COMP	$(17.6 \pm 0.03) \times 10^3$

Como trabalho futuro, seria importante averiguar se o efeito de diluição e se as estações sazonais têm efeito na concentração de HHCB nos afluentes e afluentes de ETAR. Outro contributo importante seria apurar qual a origem da casca de pinheiro que compõem o composto para esclarecer a concentração nula verificada na matriz CASCA.

5 Conclusões

O objetivo deste trabalho era a implementação de um método analítico para a deteção de galaxolide (HHCB) em matrizes ambientais. Sendo a deteção de HHCB um assunto já abordado na bibliografia, são raros os estudos que abarquem a cromatografia líquida com deteção por fluorescência (HPLC-FL) em matrizes ambientais, embora a cromatografia gasosa por espectroscopia de massa (GCMS) seja, de longe, a mais frequentemente utilizada. Esta técnica necessita de operadores especializados, tornando-se mais dispendiosa. Para a preparação das amostras adotou-se uma técnica desenvolvida para a análise de HHCB, baseado na extração da matriz numa fase sólida dispersa (Correia *et al.*, 2013). Este método foi denominado de QuEChERS, dado que é rápido (*Quick*), simples (*Easy*), económico (*Cheap*), eficaz (*Effective*), robusto (*Rugged*) e seguro (*Safe*).

Na validação do método de análise, os parâmetros de linearidade são adequados. Relativamente aos limites de deteção e quantificação, o método proposto adequa-se aos objetivos em vista pois é capaz de detetar concentrações da ordem das referidas na bibliografia. Foram obtidas precisões intermédias entre 0.8% para COMP e 15.5% para SOL-FEUP, realizando duas e seis extrações, respetivamente. Deveriam ter sido efetuadas no mínimo seis extrações para cada matriz mas, por falta de tempo, tal não foi executado. No que diz respeito à exatidão, as matrizes SOL-FEUP, SOL-ETAR, SED-LEIX e LAM apresentam resultados satisfatórios, ao passo que a exatidão das matrizes COMP e CASCA evidenciam percentagens de recuperação abaixo de 44%. Este aspeto justifica a realização de mais ensaios.

Quanto à incerteza global do método pode-se afirmar que a incerteza associada à reta de calibração é a que mais contribui para a incerteza global. Pode-se também assegurar que na gama de concentrações abordadas, a incerteza global tem um valor aproximadamente constante entre 3% e 8%, aumentando drasticamente para concentrações inferiores a 0.005 mg/kg_{amostra}, atingindo 123%.

Em suma, este é um estudo que pretendeu ser uma primeira abordagem à deteção a matrizes ambientais pelo método de QuEChERS/HPLC-FL. Os resultados obtidos são considerados aceitáveis para o objetivo do trabalho proposto, servindo de base para estudos futuros neste tipo de matrizes.

Referências

- Alves A. (2013). "Apontamentos de Métodos Instrumentais de Análise." DEQ - FEUP.
- Anastassiades, M. and Lehotay, S.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. **86**(2), 412-431.
- Arbulu, M. *et al.* (2011). "A retention time locked gas chromatography-mass spectrometry method based on stir-bar sorptive extraction and thermal desorption for automated determination of synthetic musk fragrances in natural and wastewaters." Journal of Chromatography A **1218**(20), 3048-3055.
- Balk, F. and R. A. Ford (1999). "Environmental risk assessment for the polycyclic *musks* AHTN and HHCB in the EU: I. Fate and exposure assessment." Toxicology Letters **111**(1-2): 57-79.
- Bester, K. (2004). "Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant." Chemosphere **57**(8): 863-870.
- Câmara Municipal da Maia (CMM), Estação de tratamento de águas residuais de Parada, Gráfica Maiadouro, Maia, Depósito Legal nº 600 39/92, Outubro de 2002.
- Chen, D., X. Zeng, *et al.* (2007). "The concentrations and distribution of polycyclic *musks* in a typical cosmetic plant." Chemosphere **66**(2): 252-258.
- Clara, M., O. Gans, *et al.* (2011). "Occurrence of polycyclic *musks* in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment." Chemosphere **82**(8): 1116-1123.
- Correia, P. *et al.* (2013). "Human dermal exposure to galaxolide from personal care products." International Journal of Cosmetic Science, 1-11.
- Eh, M. (2004). "New Alicyclic *Musks*: The Fourth Generation of Musk Odorants." Chemistry & Biodiversity **1**(12): 1975-1984.
- Fromme, H., T. Otto, *et al.* (2001). "Polycyclic musk fragrances in fish samples from Berlin waterways, Germany." Food Addit Contam **18**(11): 937-944.
- Gatermann, R., S. Biselli, *et al.* (2002). "Synthetic *Musks* in the Environment. Part 1: Species-Dependent Bioaccumulation of Polycyclic and Nitro Musk Fragrances in Freshwater Fish and Mussels." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **42**(4): 437-446.
- Gebauer, H. and T. Bouter (1997). "Moschus." Euro. Cosmet. **1**: 30-35.
- Gómez *et al.* (2011). "Automatic Searching and Evaluation of Priority and Emerging Contaminants in Wastewater and River Water by Stir Bar Sorptive Extraction followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry." Anal. Chem. **83**: 2638-2647

- Guo, R. *et al.* (2010). "Occurrence of synthetic *musks* in Korean sewage sludges." *Science of the Total Environment* **408**: 1634-1639.
- Heberer, T., S. Gramer, *et al.* (1999). "Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin: Part III: Determination of synthetic musk in Berlin surface water applying solid-phase microextraction (SPME)." *Acta Hydrochim Hydrobiol* **27**: 150-156.
- HERA (2004b). HERA (Human and Environmental Risk Assessment on Ingredients of Household Cleaning Products) "Environmental Risk Assessment Polycyclic *Musks* AHTN (CAS 1506-02-1) and HHCB" (CAS 122-05-05): 78.
- Herren, D. and Berset, J. D. (2000). "Nitro *musks*, nitro musk amino metabolites and polycyclic *musks* in sewage sludges." *Chemosphere* **40**: 565-574.
- Human *et al.* (2010). "Shewhart-type control charts for variation in phase I data analysis." *Computational Statistics and Data Analysis* **54**: 863-874.
- Hu, Z., Y. Shi, *et al.* (2011). "Assessment of Synthetic Musk Fragrances in Seven Wastewater Treatment Plants of Beijing, China." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **86**(3): 302-306.
- Kupper, T., J. D. Berset, *et al.* (2004). "Concentrations and specific loads of polycyclic *musks* in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland." *Chemosphere* **54**(8): 1111-1120.
- Lishman *et al.* (2006). "Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada." *Science of the Total Environment* **367**: 544-558
- OSPAR Comission. OSPAR Background Document on Musk Xylene and Other *Musks*. ISBN 1-904426-36-0 (2004).
- Peck, A., J. Kucklick, *et al.* (2007). "Synthetic musk fragrances in environmental Standard Reference Materials." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**(7): 2381-2388.
- Peck, A., E. Linebaugh, *et al.* (2006). "Synthetic musk fragrances in Lake Erie and Lake Ontario sediment cores." *Environ Sci Technol* **40**(18): 5629-5634.
- Ramírez *et al.* (2011). "Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry method for determining synthetic *musks* in water samples." *Journal of Chromatography A*, **1218**: 156-161.
- Reiner, J., J. Berset, *et al.* (2007). "Mass Flow of Polycyclic *Musks* in Two Wastewater Treatment Plants." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**(4): 451-457.
- Rimkus, G. G. (1999). "Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment." *Toxicology Letters* **111**(1-2): 37-56.
- Wu, S.-F. and Ding, W.-H. (2010). "Fast determination of synthetic polycyclic *musks* in sewage sludge and sediments by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, **1217**: 2776-2781.

- Yang, J.-J. and C. D. Metcalfe (2006). "Fate of synthetic *musks* in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids." *Science of The Total Environment* **363**(1-3): 149-165.
- Zeng, X., G. Sheng, *et al.* (2005). "Determination of polycyclic *musks* in sewage sludge from Guangdong, China using GC-EI-MS." *Chemosphere* **60**(6): 817-823.
- Zeng *et al.* (2012). "Levels and distribution of synthetic *musks* and polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge collected from Guangdong Province." *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **47**: 389-397.
- Zhang, X., Y. Yao, *et al.* (2008). "Synthetic *musks* in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China." *Chemosphere* **72**(10): 1553-1558.

Anexo

1. Incerteza associada à preparação dos padrões analíticos, U_1

A incerteza é calculada recorrendo à expressão:

$$\text{Incerteza} = \sqrt{\sum_i \frac{\Delta m_i}{m_i}} \quad (1)$$

Com,

Δm_i = erro associado à medição de um determinado parâmetro;

m_i = valor medido do respetivo parâmetro.

Os padrões analíticos utilizados para obter a reta de calibração foram preparados a partir da solução mãe de concentração 60 mg/L (Correia *et al.*, 2013).

Tabela 14 - Parâmetros para o cálculo da incerteza da solução mãe.

m (g)	$u_{\text{balança}}$ (g)	$V_{\text{balão}}$ (mL)	$u_{\text{balão}}$ (mL)	$U_{\text{sol. mãe}}$ (%)
6	0.0001	100	0.1	0.1

$$U_{\text{sol.mãe}} = \sqrt{\left(\frac{0.0001}{6}\right)^2 + \left(\frac{0.1}{100}\right)^2} = 0.1\% \quad (2)$$

Tabela 15 - Erros associados aos instrumentos de medição e incerteza dos padrões analíticos, U_1 (Correia *et al.*, 2013).

C (µg/L)	$C_{\text{sol. mãe}}$ (µg/L)	$u_{C_{\text{sol. mãe}}}$ (mg/l)	$V_{\text{microp.}}$ (µL)	$U_{\text{microp.}}$ (%)	$V_{\text{balão}}$ (mL)	$u_{\text{balão}}$ (mL)	u_C (µg/L)	U_1 padrões (%)
200.40	60000.00	0.06	83.5	0.84	25	0.04	1.7	0.9
160.32	200.40	1.722	4000	1.17	5	0.025	2.0	1.3
120.24	200.40	1.722	3000	1.28	5	0.025	1.7	1.4
80.20	200.40	1.722	4000	1.17	10	0.025	1.0	1.2
40.08	200.40	1.722	1000	0.50	5	0.025	0.3	0.7
10.02	200.40	1.722	250	0.67	5	0.025	0.1	0.8
5.01	200.40	1.722	250	0.67	10	0.025	0.04	0.7
1.00	200.40	1.722	50	0.91	10	0.025	0.01	1.0

2. Incerteza associada à reta de calibração, U_2

Tabela 16 - Parâmetros para o cálculo de U_2 (Correia *et al.*, 2013).

x_i	y_i	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2$	S_{x0}	U_2 (%)
1.00	17560	4.6×10^{11}	5800	1.2	123
5.01	47297	4.2×10^{11}	5205	1.2	24
10.02	94125	3.6×10^{11}	4508	1.2	12
40.08	361599	1.1×10^{11}	1375	1.1	3
80.20	720991	6.1×10^8	9	1.1	1
120.24	1079703	1.5×10^{11}	1856	1.2	1
160.32	1423394	5.3×10^{11}	6916	1.2	1
200.40	1824927	1.3×10^{12}	15188	1.4	1

Com,

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{a} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_i - \bar{y})^2}{a^2 \times \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

$$U_2 = \frac{S_{x0}}{x_i} \quad (4)$$

Sendo,

x_i = concentração do padrão;

y_i = área do pico cromatográfico;

n = número de injeções para cada padrão;

N = número de valores experimentais de y obtidos;

S_{x0} = desvio padrão da concentração calculado através da reta de calibração.

3. Incerteza associada à precisão, U_3

Tabela 17 - Parâmetros para o cálculo de U_3 (Correia *et al.*, 2013).

C (µg/L)	\bar{A} (mV. min)	s	u_A	U_3 (%)
1.00	13850.8	1562.2	638	4.6
5.01				1.9 ^a
10.02				1.3 ^a
40.08				0.6 ^a
80.20	710532.2	6248.4	2551	0.4
120.24				0.3 ^a
160.32				0.3 ^a
200.40	1773681.8	12033.1	4912	0.3

^a - dados obtidos por interpolação.

Com,

$$u_A = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

$$U_3 = \frac{u_A}{\bar{A}} \quad (6)$$

4. Incerteza associada à exatidão, U_4

Exemplo de cálculo para a matriz COMP.

Tabela 18 - Parâmetros para o cálculo de U_4 .

C (µg/L)	\bar{R}	s	u_R	U_4 (%)
460	29.5	0.4	0.3	1.0
4.6	11.0	0.4	0.3	2.6

 \bar{R} - recuperação média.

Com,

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

$$U_4 = \frac{u_R}{\bar{R}} \quad (8)$$

Assumiu-se o valor máximo da incerteza (2.6 %) como o valor associado a U_4 .

5. Incerteza global associada, U

Exemplo de cálculo para a matriz COMP.

Para o cálculo da incerteza global, usou-se U_4 como sendo o mesmo para todas as concentrações.

Tabela 19 - Resultados do cálculo das incertezas globais para os padrões analíticos.

C (µg/L)	U_1 (%)	U_2 (%)	U_3 (%)	U_4 (%)	U (%)
1	0.9	123	4.6	2.6	123
5.01	1.3	24	1.9	2.6	25
10.02	1.4	12	1.3	2.6	12
40.08	1.2	3	0.6	2.6	4
80.2	0.7	1	0.4	2.6	3
120.24	0.8	1	0.3	2.6	3
160.32	0.7	1	0.3	2.6	3
200.4	1.0	1	0.3	2.6	3

Com,

$$U = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2} \quad (9)$$